

Flow electroporation chamber and method

Patent Number: AU5305096
Publication date: 1996-10-02
Inventor(s): ACKER JESSE L;; MESEROL PETER M;; PRODELL RITA C
Applicant(s): ENTREMED INC
Requested Patent: CN1195997
Application Number: AU19960053050D 19960311
Priority Number(s): US19950402145 19950310; US19950004906P 19951006; WO1996US03211 19960311
IPC Classification: A61M1/36; G05D23/00; C12N13/00
EC Classification:
Equivalents: CA2214800, ☐ [EP0814855](#) (WO9628199), JP11502133T

Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - I2

[19] 中华人民共和国专利局

[51] Int. Cl.⁶

A61M 1/36

G05D 23/00 C12N 13/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96193177.9

[43] 公开日 1998 年 10 月 14 日

[11] 公开号 CN 1195997A

[22] 申请日 96.3.11

[30] 优先权

[32] 95.3.10 [33] US[31] 08 / 402,145

[32] 95.10.6 [33] US[31] 60 / 004,906

[86] 国际申请 PCT / US96 / 03211 96.3.11

[87] 国际公布 WO96 / 28199 英 96.9.19

[85] 进入国家阶段日期 97.10.9

[71] 申请人 恩特雷麦德有限公司

地址 美国马里兰

[72] 发明人 P·M·迈瑟罗尔 R·C·普罗德尔

J·L·阿克

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标

事务所

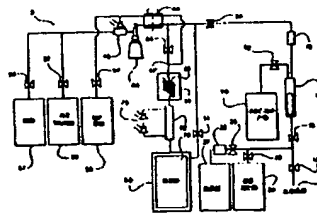
代理人 李 溪

权利要求书 3 页 说明书 39 页 附图页数 19 页

[54] 发明名称 流式电穿孔室和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于把生物活性物质包裹到红血球中的方法和设备,其特征为一个可自动的不可自动的、连续流动的、配套的电穿孔系统(5),该系统使得可以从病人体内抽出血液,分离红血球,并且选择性地重新组合血浆和改良后的红血球,从而生产出具有改良的生物特性的血液。本发明特别适用于包裹血红蛋白的别构剂,从而减小红细胞对氧气的亲和力,并且改善组织中氧从红细胞释放。血液从入口(11)引入系统(5)并且与抗凝剂(27)混合。血液和抗凝剂的混合物通过过滤器(18)并到达血液分离和洗涤滚筒(44)。血浆和白血球被导入血浆贮槽(89),而红血球保留在洗涤滚筒(44)中。分离后的红血球被泵出,并且与来自于贮槽(50)的IHP溶液在会合点(67)混合。该混合物由冷却旋管(68)冷却,然后由泵送入电穿孔室(72)进行处理。



(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 用于生物粒子穿孔的设备, 该设备包括:

限定流体流动通道的壁;

沿所说流体流动通道相对侧壁布置的电极, 该电极包括用于放置与高压脉冲电源有电联系的该电极的装置, 从而使沿所说流体流动通道移动的生物粒子经历一个脉冲电场;

所说设备的特征为至少一个限定所说流体流动通道的所说壁由易变形的弹性材料制成;

由此在所说流体流动通道内的瞬时压力的增加至少有一部分被所说壁的所说弹性材料缓冲。

2. 权利要求1的设备, 其中所说的至少一个限定所说流体流动通道且由易变形的弹性材料制成的所说壁包括两个由易变形的塑性材料制成的所说壁。

3. 权利要求1的设备, 其中所说的电极包括连续带状电极。

4. 用于生物粒子穿孔的设备, 该设备包括:

限定流体流动通道的壁;

沿所说流体流动通道相对侧壁布置的电极, 该电极包括用于放置与高压脉冲电源有电联系的该电极的装置, 从而使沿所说流体流动通道移动的生物粒子经历一个脉冲电场;

与所说流体流动通道有热联系而布置的冷却装置, 该装置用于在所说生物粒子沿所说流体流动通道移动时冷却该粒子;

用于测量沿所说流体流动通道移动的所说生物粒子的温度的信号传感装置;

对所说测量到的温度产生响应的控制装置, 该装置用于在所说生物粒子沿所说流体流动通道移动时, 控制所说粒子的冷却程度。

5. 权利要求4的设备,其中所说的冷却装置包括与所说流体流动通道有热联系的许多的热-电冷却片。

6. 权利要求5的设备,其中所说的热-电冷却片与限定所说流体流动通道的壁接触。

7. 用于生物粒子穿孔的设备,该设备包括:

限定流体流动通道的壁;

沿所说流体流动通道相对侧壁布置的电极,该电极包括用于放置与高压脉冲电源有电联系的该电极的装置,从而使沿所说流体流动通道移动的生物粒子经历一个脉冲电场;以及

与所说流体流动通道有热联系而布置的一排热-电冷却片,该冷却片用于冷却沿该流体流动通道移动的生物粒子。

8. 权利要求7的设备,其中与所说流体流动通道有热联系而布置的所说一排热-电冷却片包括与限定所说流体流动通道的所说壁接触的一排热-电冷却片。

9. 用于生物粒子穿孔的设备,该设备可以活动安装到一个支承构件上,其包括:

限定流体流动通道的壁;

沿所说流体流动通道相对侧壁布置的电极,该电极包括用于放置与高压脉冲电源有电联系的该电极的装置,从而使沿所说流体流动通道移动的生物粒子经历一个脉冲电场;以及

用于在把所说设备从所说支承构件移走之前,破坏所说电极的与该电极操作有关的装置;

由此所说设备不能重复使用。

10. 权利要求9的设备,

其中用于放置与电源有电联系的所说电极的所说装置包括一个轴，所说电极绕着一个相关轴至少一部分的周边包裹；和

其中所说的用于破坏所说电极的装置包括这样一种装置，其用于旋转所说轴，以便拉伸电极至超出其拉伸极限，从而拉断所说电极并且使该电极不能进行电学操作。

11. 用于生物粒子穿孔的设备，该设备包括：

限定流体流动通道的壁；

沿所说流体流动通道相对侧壁布置的电极，该电极包括用于放置与高压脉冲电源有电联系的该电极的装置，从而使沿所说流体流动通道移动的生物粒子经历一个脉冲电场；

用于使所说生物粒子沿所说流体流动通道移动的泵装置；以及

对所说泵使所说生物粒子沿所说流体流动通道移动的速度产生响应的控制装置，该装置用于控制所说高压电能的脉冲间隔。

由此当沿所说流体流动通道移动的所说生物粒子暴露在所说电极之间时，该生物粒子经历预定数目的脉冲。

说明书

流式电穿孔室和方法

技术领域

本发明涉及用于把生物活性物质包裹在各种细胞群中的方法和设备。更具体地讲，本发明涉及一种用于通过电穿孔把血红蛋白别构剂包裹在红细胞中，从而实现胞内血红蛋白物理特性的治疗上所需变化的方法和设备。

发明背景

在一个成年人的血管系统中，血液的体积大约为 5 到 6 升。其中大约一半的体积为细胞所占据，包括红血球(红细胞)，白血球(白细胞)和血小板。红血球组成了血液的大部分的细胞成分。血浆，即血液的液体部分，为大约 90 % 的水和 10 % 的各种溶质。这些溶质包括血浆蛋白，有机代谢物，废物和无机化合物。

红血球的主要功能是从肺部向体内组织运送氧气，以及从组织向肺部运送二氧化碳以便除去。由于氧气在水溶液中仅仅是微量溶解的，所以血浆运送非常少量的氧气。血液携带的大部分氧气由红细胞的血红蛋白运送。哺乳动物的红细胞不含细胞核，线粒体或任何其它的胞内细胞器，并且它们在自身的代谢中不消耗氧气。红血球含有大约 35 % 重量分数的血红蛋白，它们在结合和运送氧气中起作用。

血红蛋白是一种分子量大约为 64,500 道尔顿的蛋白质。它包括 4 个多肽链和 4 个与铁原子以亚铁态结合的血色素辅基。通常的珠蛋白，即血红蛋白分子的蛋白质部分，包括两个 α 链和两个 β 链。四条链中的每一条都有一个特有的三级结构，其中的链是折叠的。四条多肽链以大约四级排列结合在一起从而构成血红蛋白的特有的四级结构。在每一条多肽链上有一个血红素基，它可以可逆的结合一分子的分子氧气。当血红蛋白与氧气结合时，形成氧合血红蛋白。当释放出氧气时，氧合血红蛋白还原成脱氧血

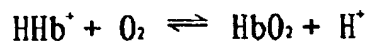
红蛋白。

向组织运送氧气依赖于许多因素，这些因素包括，血液的体积流量，红血球的数量，红血球中血红蛋白的浓度，血红蛋白对氧气的亲和力以及在某些形式上，胞内红细胞血红蛋白与高的和低的氧气亲和力的摩尔比，但是并不局限于上述因素。血红蛋白对氧气的亲和力也依赖于 4 个因素，即(1)氧气的分压；(2) pH 值；(3) 血红蛋白中起到别构剂作用的 2,3 - 二磷酸甘油酸(DPG)的浓度；以及(4)二氧化碳的浓度。在肺部，当氧气的分压为 100mmHg 时，大约 98 % 的循环血红蛋白被氧气饱和。这代表血液的总的氧气运送能力。当完全氧合后，100 毫升完整的哺乳动物的血液可以携带大约 21 毫升的气态氧气。

氧气分压和 pH 值对血红蛋白结合氧气能力的影响最好通过测定血红蛋白的氧气饱和曲线来说明。氧气饱和曲线绘制了当血红蛋白分子溶液与气相中不同的氧气分压处于平衡时，为氧气分子所占据的血红蛋白分子的总氧气结合位点的百分比。

血红蛋白的氧气饱和曲线是 S 形的。因此，结合第一个分子的氧气增加了剩余的血红蛋白结合附加氧气分子的亲和力。随氧气分压的增加达到一个峰值，在该处每个血红蛋白分子均被饱和并且含有 4 分子氧气的上限。

根据反应式：



血红蛋白对氧气的可逆结合伴随着质子的释放。因此，pH 值的增加将会使平衡向右移动，并且导致血红蛋白在给定的分压下结合更多的氧气。pH 值的降低将减少结合氧气的量。

在肺部，空气空间的氧气分压大约为 90 到 100mmHg，并且 pH 值也高于对应的正常血液的 pH 值(达到 7.6)。因此，在肺部血红蛋白趋向于几乎最大限度的被所氧气饱和。在该压力和 pH 值，血红蛋白大约有 98 % 被氧气饱和。另一方面，在周围组织内部的毛细血管中，氧气分压只有大约 25 到 40mmHg 并且 pH 值也相对较低(大约 7.2 到 7.3)。由于肌细胞快速消耗氧气，从而降低了氧气的局部浓度，因此向组织中释放部分结合的氧气是有利的。当血液通过肌肉中的毛细血管时，氧气将从红血球中接近饱和的血红蛋白中释放到血浆，然后进入肌细胞。当血红蛋白通过肌肉毛细血管时，

它将释放大约三分之一的结合氧气，因此当它离开肌肉时，它将只有大约 64 % 被饱和。通常，在离开组织循环的静脉血液中的血红蛋白是被介于大约 65 % 和 97 % 之间的在肺部与周围组织中反复循环的氧气所饱和。因此，氧气分压和 pH 值通过血红蛋白共同影响氧气的释放。

第三个调节血红蛋白氧合作用程度的重要因素是别构剂 2,3 - 二磷酸甘油酸(DPG)。DPG 是哺乳动物红细胞中血红蛋白的普通的生理效应物。DPG 调节与肺部氧气分压有关的红血球中血红蛋白的氧气-结合亲和力。通常，在细胞中 DPG 的浓度越高，血红蛋白对氧气的亲和力越低。

当缓慢地减少氧气向组织中的传送时，正常人的红细胞中 DPG 的浓度增加。例如，在高空氧气分压明显较低。相应的，组织中的氧气分压也较低。在一个正常人移动到更高处后的几小时内，红血球中 DPG 的含量增加，并导致更多的 DPG 被结合，以及血红蛋白的氧气亲和力降低。红血球中 DPG 含量的增加也会发生在患有缺氧症的病人中。该调节使得血红蛋白可以更容易的释放出结合的氧气以补偿在肺部血红蛋白下降的氧合作用。当人们适应高空并且下降到低处会发生相反的变化。

当通常从血液中分离时，血红蛋白含有相当多的 DPG。当血红蛋白被“剥去” DPG 时，它显示出对氧气更高的亲和力。当增加 DPG 时，血红蛋白的氧气结合亲和力降低。因此如 DPG 的生理别构剂对血红蛋白在组织中氧气的正常释放是必需的。

虽然 DPG 是哺乳动物红血球中血红蛋白的正常的生理效应物，但是发现磷酸化的肌醇在一些鸟类和爬行动物的红细胞中起着类似的作用。尽管 IHP 不能穿过哺乳动物红细胞的细胞膜，它可以在 DPG 的结合位点与哺乳动物红血球的血红蛋白结合以改进血红蛋白的别构结构，其作用的结果是减小血红蛋白对氧气的亲和力。例如，DPG 可以被肌醇六磷酸(IHP)取代。在减小血红蛋白的氧气亲和力方面 IHP 甚至比 DPG 更有效。IHP 对血红蛋白的亲和力比 DPG 高 1000 倍(R. E. Benesch 等，生物化学，第 16 卷，2594-2597 页(1977))并且在 37 °C，pH 值为 7.4 时将血红蛋白的 P_{50} 增加到 96.4 mmHg (生物化学杂志，第 250 卷，7093-7098 页(1975))。

通过向红细胞引入某种血红蛋白别构剂可以增强哺乳动物红血球的氧气释放能力，从而降低了血红蛋白对氧气的亲和力并且改善了血液中氧气

的经济利用。该现象表明存在用于治疗由于肺部或循环系统功能缺乏而使组织经历低氧合作用的病人的多种医学应用。

因为使用这些改进的红细胞可以实现潜在的医学利益，在现有技术中研制了多种技术以便使得把血红蛋白别构剂在红细胞中包裹。相应地，已经设计了许多设备以辅助或简化包裹过程。在现有技术中已知的包裹方法包括渗透脉冲（膨胀）和细胞的重新构建，控制裂解和重新填缝（resealing），脂质体的掺入以及电穿孔。在适于商业应用的规模上，现有的电穿孔方法使得该工艺在商业上是不实际的。

下述的参考文献描述了通过载有 IHP 的脂质体的相互作用将多聚磷酸掺入到红血球中的方法：Gersonde 等“通过把多聚磷酸掺入到原有的红血球以改良胞内血红蛋白的氧气亲和力并且增强氧气在毛细血管系统中的释放”，*Biblthca. Haemat.*，46 卷，81-92 页（1980）；Gersonde 等“通过与含脂囊泡的效应物融合掺入肌醇六磷酸后增强人类红血球的 O_2 释放能力和玻尔效应”，血红蛋白的协同结合起源，（1982）；和 Weiner，“通过脂质体技术在能存活的红血球中右移 $Hb-O_2$ 的解离”细胞生物学，第 47 卷，（1983）。

另外，Nicolau 等的美国专利 4,192,869，4,321,259 和 4,473,563 描述了一种通过把流体-带电脂囊泡与红细胞融合，向红血球中储藏其内含物的方法。通过这种方式，可能将别构剂如肌醇六磷酸运送到红细胞中，在该细胞中，由于更高的结合常数，IHP 取代了位于血红蛋白的结合位点上的 DPG。

根据脂质体技术，IHP 溶解在磷酸缓冲液中直到溶液饱和并且把脂囊泡混合物悬浮在溶液中。然后把悬浮物进行超声处理或注射过程，随后离心。上层悬浮物包含含有 IHP 的小脂囊泡，然后收集它们。在含有 IHP 的脂囊泡与红细胞的细胞膜融合的期间内，将红细胞加入到收集后的悬浮液中并且温育，从而把其内含物保存到红细胞的内部。然后洗涤改良的红细胞并且加入到血浆中以生成产品。

脂质体技术的缺点包括掺入到红细胞中的 IHP 浓度的低重复性和随后处理中红血球的明显溶血作用。此外，由于该过程冗长而复杂，其商业化是不实际的。

为了解决脂质体技术的缺点，发展了一种裂解和重新填缝红血球的方法。该方法在下述出版物中有所描述：Nicolau 等“在红血球中掺入血红蛋白别构剂.生理效应,” *Biblitheca. Haemat.*, 第51卷, 92-107页(1985). Ropars 等的相关美国专利 4,752,586 和 4,652,449 也描述了一种通过控制红细胞的裂解和重新填缝把具有生物活性的物质包裹在人类或动物红细胞中的方法，该方法避免了 RBC-脂质体的相互作用。

该技术最大的特征为以类似于渗透脉冲技术起作用的连续流动透析系统。具体的说，向至少一个透析元件的一次隔板连续提供红细胞的液态悬浮物，同时透析元件的二次隔板含有相对于红细胞悬浮物是低渗的水溶液。低渗溶液导致红细胞裂解。然后使红细胞裂解物与生物活性物质接触从而使其掺入到红细胞中。为了使红细胞细胞膜重新填缝，增加红细胞裂解物的渗透和/或肿胀压，回收重新填缝的红细胞悬浮液。

在 Gooddrish 等的相关美国专利 4,874,690 和 5,043,261 中公开了一种涉及红血球冷冻干燥和重新构建的相关技术。作为重新构建红血球过程的一部分，文中描述了添加各种聚阴离子，包括肌醇六磷酸。根据公开的方法，处理红血球会生成活性未受影响的细胞。推测起来，在重新构建过程中把 IHP 掺入到细胞，从而维持血红蛋白的活性。

在 Franco 等的美国专利 4,478,824 和 4,931,276 中描述了通过有效的裂解和重新填缝将包括肌醇六磷酸的有效试剂引入到哺乳动物的红血球中的第二个相关的方法和设备。该过程被称作“渗透脉冲技术”。在实施渗透脉冲技术中，在含有易于扩散进、出细胞的化合物的溶液中悬浮和温育包裹后的红血球原料，其中该化合物的浓度应以足够引起其扩散到细胞中以便使细胞的内含物变成高渗为准。接下来，在至少一种所需的待引入试剂存在下，通过一种基本上等渗的液体介质来稀释含有高渗细胞的溶液以形成跨膜离子梯度，从而引起水扩散到细胞中并导致膨胀以及细胞外膜渗透率的增加。该“渗透脉冲”引起水扩散到细胞中并且造成了细胞的膨胀，上述膨胀可以增加外层细胞膜对所需试剂的渗透率。膜渗透率的增加会维持一段时间，这段时间仅够用于向细胞运送至少一种试剂以及化合物扩散出细胞。

在实施渗透脉冲中可以使用的聚阴离子包括焦磷酸，三聚磷酸盐，磷

酸化的肌醇, 2, 3-二磷酸甘油酸(DPG), 腺苷三磷酸, 肝素和可溶于水并且对红血球的脂质外层双层膜无破坏性的多羧酸。

渗透脉冲技术有几个缺点, 这些缺点包括包裹产率低, 不完全的重新填缝, 细胞成分的损失和相应的细胞寿命的减少。该技术冗长, 复杂并且不适于自动化操作。由于这些原因, 渗透脉冲技术几乎没有成功的商业应用。

用于在红细胞中包裹各种生物活性物质的另一种方法是电穿孔, 电穿孔已经用于在不同的细胞类型中包裹外源分子, 包括如 Mounieime 等在“通过使用电穿孔在红血球中包裹肌醇六磷酸而引起氧合作用解离曲线的稳定右移”, FEBS, 275 卷, 1, 2 期, 117 - 120 页(1990)中所述的 IHP 红细胞。

电穿孔的方法涉及通过在含有细胞或泡囊(vesicles)的液态细胞悬浮液的两侧施加电场脉冲从而在细胞膜或任意的泡囊中形成微孔。在穿孔过程中, 细胞悬浮在液体介质中然后经历一个电场脉冲。该介质可以是电解质, 非电解质, 或电解质和非电解质的混合物。作用到悬浮液上的电场强度和脉冲长度(作用到细胞悬浮液上的电场的时间)根据细胞的类型变化。为了在细胞的外膜上产生微孔, 所施加的电场必须有足够的时间长度和足够的电压以便在足够长的一段时间内在细胞膜的两侧产生一个设定的电压而生成微孔。

有四个现象可能在电穿孔的过程中起作用。第一个现象是绝缘击穿。绝缘击穿指的是高电场在细胞膜上产生小的微孔或洞的能力。一旦产生微孔, 细胞就可以荷载生物活性物质。第二个现象是绝缘聚束效应, 它指的是在均匀的电场中通过泡囊的堆放(placement)产生相互自吸引。第三个现象是泡囊融合。泡囊融合指的是通过绝缘击穿产生微孔的生物泡囊的膜在近距离内与其在绝缘击穿位点处结合在一起的趋势。第四个现象是在高频电场存在下细胞沿着它们的一个轴排列成一条直线的趋势。因此, 为了荷载和卸下细胞泡囊, 电穿孔涉及在泡囊旋转预定位, 泡囊穿孔和泡囊的介电常数中的应用。

电穿孔已经有效地用于在红细胞中掺入血红蛋白的别构剂。在 Mounieime, Y 等的一篇文章(参见“通过使用电穿孔在红血球中包裹肌醇

六磷酸而引起氧合作用解离常数的稳定右移”，FEBS，第275卷，1,2期，11-120页(1990年11月))中，Mouneimne及其同事报道了在处理过的含有掺入IHP的红细胞中可以实现血红蛋白-氧气解离的右移。荷载IHP后24小时和48小时的测定显示存在一个稳定的 P_{50} ，这表明红细胞的重新填缝是持久的。而且，结果显示荷载肌醇六磷酸的红血球有正常的11天半衰期。但是，由Mouneimne及其同得所得到的结果表明在输血的头24小时内大约有20%的重新输入的细胞损失。

在现有技术中公开的电穿孔方法不适于处理大量的样品也不能使用高的或重复的充电。而且，该方法不适用于连续的或“流动的”电穿孔室。可得到的电穿孔室被设计为仅在静态使用。即，间歇处理样品。“静态”室的连续使用导致该室过热并且增加细胞的裂解。而且，现有技术不能在足够百分比的待处理的细胞中掺入足够量的IHP以显著改变血液的氧气携带能力。此外，现有技术的方法需要精制的设备并且不适于在护理期间荷载病人的红血球。因此，该过程耗时并且不适用于商业规模。

人们所需要的是用于在红细胞中包裹生物活性物质的简单，有效和快速的方法，与此同时，该方法还能保持细胞的完整性和生物功能。生物改性血液细胞的潜在的治疗用途表明需要在原有的红细胞中包裹生物活性物质，包括血红蛋白的别构剂的更为简单，更有效和完整的方法。

许多的临床病例将受益于这种治疗，它可以增加结合到血红蛋白的氧气的组织运送。例如，现在美国的主要死亡原因是心血管疾病。许多心血管疾病的严重症状和病状包括充血性心力衰竭，心肌梗死，中风，间歇性跛行和镰状细胞贫血，而这些是由浸泡组织的液体中的氧气供应不足引起的。类似的，出血，外伤或手术后的严重失血会导致重要器官的氧气供应减少。没有氧气，在距心脏很远处的组织，甚至心脏自身，都不能产生足够的能量以维持其正常功能。丧失氧气的结果是组织死亡和器官损坏。

尽管美国公众的注意力长期集中在减轻心脏疾病所需的预防措施上，如锻炼，适当的饮食习惯和适度的酒精消耗，死亡仍以惊人的速度继续发生。由于死亡是由氧气丧失引起的，反过来它又导致组织破坏和/或器官丧失功能。一种减轻心血管疾病威胁生命的方法是在严重胁迫下增加组织的氧合作用。同样的方法也适用于遭受失血或慢性缺氧症失调如充血性心力

衰竭的人。

受益于提高氧气向组织运送的另一种情况是贫血症。相当一部分的医院病人患有由血液中红血球或血红蛋白的量不足而引起的贫血症或低的“crit”。这导致在他们组织中不充足的氧合作用和随之产生的并发症。一般的，医生可以向病人输入封装的红血球单位来暂时纠正这种情况。

增强血液氧合作用也可以减少异源输血的数量并在更多的情况下可以使用自身输血。用于治疗缺氧症或补充血液损失的现有方法是输入完整的人类的血液。据估计在美国每年有三到四百万病人由于手术或医疗需要接受输血。在有更多时间的情况下，上述方法有利于完全避免使用献血者或异源血液而代之以使用自身血液。

经常在手术前可以抽出和储存的血液的量限制了自身血液的使用。一般的，手术病人在手术前没有足够的时间捐献足够量的血液。一个手术需要几个单位(unit)可用的血液。由于每个单位在献血期间需要几周的时间并且不能在手术前少于两周的时间内完成，获得足够的血液供应经常是不可能的。通过用 IHP 处理自身血液，将需要更少的血液并且可能完全避免输入异源血液。

由于 IHP 处理过的红血球运送氧气的量是未处理红血球的 2-3 倍，在许多情况下，医生需要输入更少单元的 IHP 处理过的红血球。这使病人更少的接受异源血液，减少了从献血者感染病毒疾病的范围并使由于输血引起的免疫功能紊乱降到最低。输入更有效的红血球的能力在当病人血液体积过剩的情况下也是有好处的。在其它更严重的情况下，当失去氧气运送能力时，迅速改善病人组织的氧合作用能力可以挽救生命。

尽管增强氧气输送到组织的方法有潜在的医学应用是显而易见的，但目前还没有在临床上可用于增加结合到血红蛋白上的氧气的组织输送的方法。使用 DPG 或 DPG 前体物分子，在动物试验中暂时的、6 到 12 小时提高氧气的储藏已见报道。但是，在体内 DPG 合成的自然调节和它相对短的生物丰衰期限限制了 DPG 的浓度和改进后的组织 PO_2 的持续时间，从而限制了它的医疗应用。

人们所需要的是在不破坏红细胞的情况下，用于在红细胞中包裹生物活性物质，如 IHP 的简单、有效和快速的方法。

发明概述

本发明涉及一种用于在不同的细胞群中包裹生物活性物质的方法和设备。更具体地说，本发明提供了一种可以形成一个自动的，配套的(self-contained)流式(flow)设备的电穿孔室，其用于在红血球中包裹化合物或组合物(如肌醇六磷酸)，从而降低血红蛋白对氧气的亲和力并增强经红血球向组织运送氧气的能力。包裹优选地通过电穿孔实现；但是，可以预料其它的包裹方法也可以用于实施本发明。本发明的方法和设备，包括所述电穿孔室同样适用于在各种细胞群中包裹各种生物活性物质。

本发明的设备和方法适用于在细胞和脂囊泡中掺入各种生物活性物质。本发明的方法，设备和室可以用于将化合物或生物活性物质引入到泡囊中，而不管该泡囊是遗传改造的还是天然产生的。例如，本发明的设备，方法和室可以用于将 IHP 引入红细胞。

按照本发明，通过电穿孔在红血球中包裹肌醇六磷酸导致血红蛋白对氧气的亲和力明显降低而不影响寿命、ATP 含量、 K^+ 含量或细胞的正常流变能力。此外，除了使 O_2 结合曲线右移外玻尔效应也不发生改变。降低红细胞的氧气亲和力增加了红细胞解离结合氧的能力，从而改善了组织的供氧。增强红细胞的氧气释放能力产生明显的生理效应，如心脏输出量的减小，动静脉差的增加和组织氧合作用的改善。

按照本发明制备的具有改进的氧气释放能力的改良红细胞可以在下述的情况下得到应用：

1. 在低的氧气分压的条件下，如高处；
2. 当肺部的氧气交换表面减小时，如在气肿中发生的情况；
3. 当在肺部存在增加的氧气扩散阻力时，如在肺炎或哮喘中发生的情况；
4. 当红细胞的氧气运送能力减小时，如红细胞减少或贫血症中发生的情况或当使用动静脉分流时；
5. 治疗血液循环紊乱，如动脉硬化、血栓栓塞、器官梗塞、充血性心力衰竭、心机能不全或局部缺血；
6. 治疗血红蛋白高的氧气亲和力的情况，如血红蛋白突变，在血红蛋白链中 N-末端氨基酸的化学修饰或在红细胞中的酶缺陷；

7. 通过改善氧气的供应加速解毒过程;
8. 减小储藏后的血液的氧气亲和力; 或
9. 改善各种癌症治疗的效力。

按照本发明的方法和设备, 有可能生产出对血液的改善的氧气经济利用作出贡献的改良红细胞。这些改良的红细胞是通过红细胞细胞膜的电穿孔以掺入别构剂(如 IHP)得到的。

按照本发明的方法的将生物活性物质掺入到细胞中(包括将血红蛋白别构剂包裹到红细胞中)是通过自动的流式电穿孔设备在体外进行的。简单地说, 将细胞悬浮液引入流式包裹设备的分离和洗涤辊筒(bowl)室中。将细胞从悬浮液中分离, 洗涤并且重新悬浮在待引入细胞的生物活性物质的溶液中。将该悬浮液引入到电穿孔室然后温育。电穿孔和温育后, 将细胞洗涤和分离。可有可无地进行杂质检测以证实所有的未包裹生物活性物质已被除去。然后, 制备用于储存或重新引入到病人体内的细胞。

按照本发明并参照优选的实施方案, 从病人体内抽出血液, 从抽出的血液中分离红细胞, 通过掺入别构剂改良红细胞以及重新构建改良的红细胞和血浆。通过这种方式, 制备和储存含有 IHP-改良红细胞的血液是可能的。

本发明的设备提供了一种用于在细胞中包裹生物活性物质的改进的方法, 该设备包括一种配套的从而也是无菌的设备(其可以在一个短的时间期限内处理大量的细胞), 一种具有改进的杂质检测、冷却和温育元件的设备, 一种完全自动的并且一旦样品引入到装置中就不需要技术人员主动控制的设备。

因此, 本发明的一个目的是提供一种自动的, 连续流动的包裹设备。

本发明的又一个目的是提供一种自动的, 连续流动的电穿孔设备。

本发明的又一个目的是提供一种连续流动的包裹设备, 该设备可以生产荷载细胞或泡囊的均匀群体。

本发明的另一个目的是提供一种连续流动的电穿孔设备, 该设备可以生产荷载细胞或泡囊的均匀群体。

本发明的另一个目的是提供一种在细胞中包裹生物活性物质的无菌及不发热的方法。

本发明的另一个目的是提供一种在电穿孔后引起稳定的细胞或泡囊重新填缝的方法和设备，以使在电穿孔后改良的细胞或泡囊的裂解最小。

本发明的另一个目的是提供一种流式包裹设备，该设备可以生产从中已除去所有外源的未包裹的生物活性物质的改良的细胞群。

本发明的另一个目的是提供一种电穿孔设备，该设备可以生产从中已除去所有外源的未包裹的生物活性物质的改良的细胞群。

本发明的另一个目的是提供一种使得可以在细胞或泡囊群体中连续包裹生物活性物质的方法和设备。

本发明的又一个目的是提供一种在单个循环中可以达到上述定义的目的、特征和优点的方法和设备。

本发明的另一个目的是提供一种连续流式电穿孔室。

本发明的另一个目的是提供一种改进的和比现有可用方法更有效的在细胞中胶囊化生物活性物质的方法。

本发明的又一个目的是提供一种适用于治疗由氧合作用缺乏或降低引起的疾病和/或病态的组合物。

通过结合附图和所附权利要求阅读以下本发明优选实施方案的详细描述，本发明的其它目的、特征和优点会显而易见。

附图简要说明

图1是连续流式包裹设备的第一个实施方案的示意图。

图2是连续流式包裹设备的第二个实施方案的示意图。

图3是带有电极的流式电穿孔室的第一个实施方案的俯视图。

图4是不带电极的流式电穿孔室的第二个实施方案的俯视图。

图5是流式电穿孔室的第一个实施方案的侧视图。

图6是流式电穿孔室的第一个实施方案的仰视图。

图7是流式电穿孔室的第一个实施方案所采用的电极的侧视图。

图8是图7电极的主视图。

图9是流式电穿孔室的第二个实施方案的部件分解透视图。

图10是图9装配后的流式电穿孔室的透视图。

图11是在静止或流动条件下、不同场强效果的比较图，它以包裹 IHP

的红血球的氧合作用的百分数为基准。

图 12 是在静止或流动条件下、不同场强效果的比较图表，它以包裹 IHP 的红血球的 P_{50} 值为基准。

图 13 是在静止与流动的条件下、在不同的场强下，经历电穿孔的红血球存活率的比较图表。

图 14 是按照本发明电穿孔室的第三个实施方案的支承构件的前视图。

图 15 是沿着图 14 的直线 15-15 剖取的图 14 支承构件的横断面视图。

图 16 是图 15 的圆圈 16 所指部分的放大图。

图 17 是按照本发明电穿孔室的第三个实施方案及其所安装到的支承柱的部件分解透视图。

图 18 是显示被安装到支承柱上的图 17 的电穿孔室的透视图。

图 19 是被安装到支承柱上的电穿孔室第三个实施方案的前正视图。

图 20 是图 19 的电穿孔室与支承柱的透视剖视图。

图 21 是一个包含图 14-20 的电穿孔室的配套电穿孔设备的示意图。

图 22 是显示几种 IHP 溶液的电阻的附图。

图 23 是连续流式包裹设备的第三个实施方案的示意图。

图 24 是一个细胞洗涤设备的剖视图。

图 25 是细胞板 526 的侧视图，它表明限定迷宫 (labyrinth) 的肋板 (ridge) 以及表明细胞悬浮液循环的管道。

图 26 是细胞洗涤设备的第二个实施方案的剖视图。

图 27 是弹性室的侧面剖视图。

图 28 是显示具有代表性的电穿孔电压的图形。

发明详述

本发明提供了一种用于在如红血球的细胞中包裹如肌醇六磷酸的别构化合物或组合物的自动、配套的流式设备。在一个具体的实施方案中，本发明的设备结合了一个血浆除去设备和一个流式电穿孔设备的特征，从而组成了一种自动、配套的流式电穿孔设备。本发明还包括一种新的流式电穿孔室，它可以使得除在静止条件以外还可以在流动的条件下使用该电穿孔室。可以预料包括本发明的电穿孔室的方法和设备可以用于在各种各样

的细胞群体中包裹各种生物活性物质。

此外，本发明提供了一群改良细胞，这些细胞具有对治疗需要或受益于氧气向组织中运送增加的疾病特别有利的物理特性。按照本发明的方法，可以得到荷载 IHP 的红血球均匀群体，同时杂质也有所减少，而且包裹后裂解的特性也有所下降。处理过的红血球在血液循环中显示出具有正常的寿命。采用本发明，一个需要治疗的病人的红血球可以被迅速荷载并且返回到病人的血液循环中。

于 1994 年 3 月 23 日提交的相关的国际申请 PCT/U. S. 94/03189 引入本文以供参考，该申请为 1993 年 3 月 23 日提交的美国申请号 035,467 的延续。

参照本发明设备优选的使用方法，下面描述了本发明的设备的操作方法，即在红血球中包裹血红蛋白别构剂的方法。肌醇六磷酸是本发明所使用的优选的别构剂。也可以使用其它糖磷酸酯，如肌醇五磷酸，肌醇四磷酸，肌醇三磷酸，肌醇二磷酸和双磷酸酯肌醇二磷酸。其它合适的别构剂包括多磷酸酯，如核苷酸三磷酸，核苷酸二磷酸，核苷酸单磷酸和醇磷酸酯。在血红蛋白的某种突变(如“苏黎士”血红蛋白)的情况下，有机阴离子，如多羧酸，可以用作别构剂。最后，可以采用无机阴离子，如六氟基高铁酸盐，磷酸盐或氯化物作别构剂。

已经按照本发明荷载了肌醇六磷酸的红血球可以用于治疗一个很宽种类的疾病与病态。可以将按照本发明制成的荷载 IHP 的红血球向正患心脏病的病人给药，从而提高氧气向局部缺血的心脏组织的传递并且同时减少心脏输出。按照本发明制成的荷载 IHP 的红血球也可以用于治疗任意一种局部缺血的情况，这种情况包括“出血性”贫血、外科手术并发症、中风、糖尿病、镰状细胞疾病、烧伤、间歇性跛行、气肿、低温症、末梢血管疾病、充血性心力衰竭、绞痛、瞬时局部缺血病、散布血管内血凝固、成人呼吸窘迫综合征以及囊性纤维化，但是并不局限于此。下文给出了按照本发明的方法制备的组合物的医疗应用的详细描述。

连续流式包裹设备

下面参照本发明的设备的最佳使用方法，即通过电穿孔在红血球中包

裹血红蛋白的别构剂来描述本发明设备的操作方法。应当了解到可以改造该设备以使其适应其它的细胞群体或泡囊以及其它的生物活性物质。此外可以改造该设备以便利用除电穿孔以外的其它包裹方法。

简而言之，按照本发明的方法是将一个血液样品引入到连续流式包裹设备中。如果正在收集红血球的话，血液或者可以从病人体内直接抽出或者可以预先抽出。一开始把血液分成红血球、血浆与白血球以及废品。废品包括在离心后存留于上清液中的稀释剂与各种各样的血液溶解物。它们储存在该设备的废物贮槽中。当把红血球与待包裹的物质混合时，血浆与白血球也保留在该系统的一个贮槽中。然后将红血球的悬浮液进行电穿孔。电穿孔之后，在可以使红血球重新填缝的条件下温育该细胞。然后处理并洗涤这些细胞以除去外源的、未被包裹的生物活性物质。当该细胞处理后，含有被包裹物质的红血球可以选择性地与血浆和白血球进行重新构建。然后将重新构建的血液直接返回到病人体内或者储存起来以后再使用。尽管该过程是以不连续的步骤进行描述的，但这一过程实质上是连续的。

参照图 1 描述了本发明的第一个实施方案，图 1 以示意图说明本发明的连续流式包裹设备的结构。

按照本发明，在进料口 11 将全部血液送入电穿孔系统 5 中。血液样品可以选择性地直接从病人体内抽出而进入电穿孔系统 5 或者可以在更早的时间里抽出血液并在引入系统 5 之前先储存起来。打开阀门 12 使得该样品进入系统 5。与此同时，打开阀门 25 且开启泵 22 投入使用以便从抗凝剂贮槽 27 中供给抗凝剂。尽管可以采用其它的抗凝剂，但一种合适的抗凝剂是肝素。优选的抗凝剂是 ACD。阀门 15 和 36 也被打开且开启泵 40。抗凝剂与全部血液的混合物通过过滤器 18 和一个监测穿过该设备的流动的压力测定系统 19，并且在一个当开启泵 40 的时候所启动的血液分离与洗涤辊筒 44 中收集该混合物。当血液分离与洗涤辊筒 44 中已经充满红血球时，传感器会指示。当其被填满时，停止血液的供应。可以通过一个血浆去除设备，比如由 Haemonetics 公司 (Haemonetics 公司, Braintree, MA) 所生产的血浆去除设备来实现与血液成分的分离有关的步骤。

正如上面所解释的，当泵 40 以顺时针方向转动时，启动血液分离与洗

涤辊筒 44 并且离心抗凝剂与全部血液的悬浮液以分离血浆、白血球、红血球和废物。打开阀门 87，从而把血浆和白血球送入血浆贮槽 89 中。

选择性地并且取决于通过该设备处理的细胞群，洗涤保留在血液分离与洗涤辊筒 44 中的细胞。打开阀门 33，15 和 36，从而将来自稀释剂贮槽 30 的盐水缓冲液送入含有红血球的血液分离与洗涤辊筒 44 中。泵 40 仍在运转。然后洗涤并离心红血球。尽管其它的生理等渗缓冲液也可以用作稀释剂和洗涤红血球，优选的盐水缓冲液为 0.9 % 氯化钠溶液。在洗涤过程中打开阀门 54，从而将废物送入废物贮槽 57 中。废物又一次被储存在废物贮槽中，并且该红血球保留在血液分离与洗涤辊筒 44 中。如有必要的话重复该洗涤步骤。

通过在脉冲长度与场强的多种变化下进行的实验，已经发现矩形脉冲会造成人的红细胞包裹 IHP 的效果不好。在细胞膜上产生的大孔对胞外 IHP 进入红血球而言似乎是不充分的。这表明在孔产生之后，存在一个比 IHP 向细胞扩散更为复杂的过程。应当指出电脉冲必须实现两个任务。第一个任务是在细胞膜上产生孔，第二个任务是 IHP 穿过上述孔进入红血球的快速的电泳移动。这可以通过在较低电压的指数形脉冲 (1.5 至 1.75 kV/cm, 5 ms) 之后立即采用高电压的矩形脉冲 (2.13 kV/cm, 2 ms) 来实现，从而导致 IHP 向红血球中的包裹比通常的指数形脉冲方式的包裹提高了 50 %。在电穿孔阈值之下，指数形脉冲自身是合适的。通过采用指数形脉冲可以最有效地实现这两个任务，即孔形成与电泳移动。另一个具体的实施方案是先将细胞暴露在一个高压矩形脉冲下，然后暴露于一系列倾向于驱使 IHP 进入红血球的低压脉冲下，从而造成进入细胞的更有效的 IHP 荷载。在使用当中，将穿过本发明的电穿孔室的细胞暴露在一系列的脉冲串下。脉冲串介于 80 和 512 个脉冲之间，其中优选的脉冲数目为 312 个脉冲。然后改变极性，并且向细胞施加第二脉冲串。当施加第三套脉冲时，又一次改变极性。对于给定的细胞，当它穿过电穿孔室的长度时，将施加三至五个脉冲串，其中在每个脉冲串之间转换极性。

红血球经分离之后，使泵 40 转向，关闭泵 22，关闭阀门 12、15、33、36、25、87 和 54，并且打开阀门 97 和 64。在用泵把红血球从血液分离与洗涤辊筒 44 中抽入冷却旋管 68 的同时，从 IHP 贮槽 50 中抽出 IHP

溶液。在位于会合点 67 处的设备的管道中混合红血球与 IHP 溶液，然后用泵使其通过冷却旋管 68。在本发明的一个优选的实施方案中并且正如下文所详细解释的，在把 IHP 溶液与红血球送入冷却旋管 68 之前也可以在分离与洗涤辊筒 44 中混合它们。

溶液中 IHP 的优选浓度为介于大约 10mMol 与 100mMol 之间，其中一个更为优选的浓度大约为 22.5 至 50mMol，并且最优选的浓度为 35mMol。IHP 溶液中 KCl 的优选浓度为介于大约 10mM 与 5mM 之间。MgCl₂ 的优选浓度为介于大约 2mM 与 0.5mM 之间。IHP 溶液中蔗糖的优选浓度为介于大约 67.5mM 与 270mM 之间。应当了解到也可以使用其它的糖或聚合物来代替蔗糖。

在本发明中所使用的溶液是电阻增强流体。注意到该 IHP 溶液应具有高的电阻率与最少的电解质是重要的。Aldrich 化学品公司或 Matrea 化学品公司的 IHP 不含任何氯化钠以及最少的其它的电解质。因此上述 IHP 没有显著降低该溶液的电阻率。该溶液的毫渗量应当介于大约 300 与 500 之间。其电阻率应当介于大约 87 $\Omega \cdot \text{cm}$ 与 185 $\Omega \cdot \text{cm}$ 之间。其导电率应当介于大约 4 至 8nS/cm 之间。其实际的盐浓度应当介于大约 4 与 9ppt 之间，并且 NaCl 当量应当介于大约 4.5 与 9.0ppt 之间。

悬浮液的血细胞比容优选介于大约 30 与 80 之间，其中最优选的血细胞比容大约为 40。从红细胞响应中已经测定了在静止的细胞中(其间距为 0.4cm) 高压不应当超过 800 伏，这对应于 2kV/cm。对于流动细胞而言，它们具有 0.3cm 的间隙，那么在细胞两侧的电压将限制到 600 伏(+/-300V)。已经测试了许多不同的电穿孔流体组合物。表 A 列出了六个样品及其特性。在 E 栏下的溶液是优选的电穿孔溶液。泵 40 用来抽出红血球和 IHP 溶液并且可以进行调节，从而能够预先决定进入冷却旋管 68 的最终的血细胞比容。

表 A

	A ^a	B ^b	C ^c	D ^d	E ^e	CBR ^f
导电率(nS/cm)	2.78	8.92	11.2	8.67	7.07	16.8

电阻率 (ohm-cm)	361	112	89.1	115	134	59.3
mOsm	379	472	408	397	314	452
实际盐浓度 (ppt)	1.54	5.43	6.91	5.24	4.45	11
NaCl 当量 (ppt)	1.71	5.43	6.76	5.25	4.59	10.2
pH	7.39	7.346	7.185	7.316	7.4	7.42
肌醇六磷酸 (IHP)	Aldric h IHP	Sigma IHP	Aldric h IHP	Aldric h IHP	Matrey a IHP	Sigma IHP

a 10 mmol KCl, 2 mmol MgCl₂, 270 mmol 蔗糖, 35 mmol

IHP

b 除了 IHP 的钾盐以外, 其余与 A 均相同

c Iscove s 改良的 Dulbecco s 125 mmol Su

d Dulbecco s 磷酸缓冲盐水, 125 mmol 蔗糖

e 5 mmol KCl, 1 mmol MgCl₂, 135 mmol 蔗糖

f 33 mmol K₂HPO₄, 7.0 mmol NaH₂PO₄, 30.6 mmol KCl, 6.4

mmol NaCl, 7.3 mmol 蔗糖, 5.0 mmol ATP

在混合后, 用泵使红血球-IHP 悬浮液通过冷却旋管 68. 可以采用水浴或者采用一个基于热-电的冷却系统进行冷却. 例如, 将冷却旋管 68 浸没在冷却贮槽 69 中的一个冷却浴里. 当红血球-IHP 悬浮液经过冷却旋管 68 时, 把该悬浮液的温度冷却至介于大约 1 °C 与 12 °C 之间, 优选大约为 4 °C. 冷却红血球确保了在电穿孔过程中细胞膜上产生的孔的存留. 通过提高该样品与冷却元件接触的表面积, 采用冷却旋管有利于加速冷却. 该冷却旋管可以可有可无地用一个热-电热泵进行包围.

某些场合下可能需要在电穿孔之前加热细胞悬浮液. 在这种情况下, 可以用加热旋管代替冷却旋管 68. 红血球所能忍受的最高温度大约为 37 °C.

电加热泵是通过从一个特殊区域内抽取热能以降低其自身的温度，然后将热能再排入一个较高温度的“热沉”(heatsink)区域来工作的。在冷的会合点，当电子从p-型半导体元件上的低能级转入n-型半导体元件上较高的能级时，电子将吸收能量。电源提供了移动电子穿过该系统的能量。在热的会合点，当电子从一个高能级元件(n-型)向一个较低能级的元件(p-型)移动时，能量被排入一个散热装置中。

热电元件全部呈固态并且不具有移动的机械零件或者也不象蒸汽-循环设备那样需要工作流体。但是，热电热泵可以实现与基于氟利昂的蒸汽压缩或吸收式制冷机同样的冷却功能。热电热泵高度安全可靠，尺寸和体积小，成本低，重量轻，它实质上比许多其它的冷却设备更为安全并能实现精确的温度控制。

在本发明中使用的优选的热电热泵是由新泽西Trenton的MELCOR材料电子产品公司所生产的。热电偶由高效结晶半导体材料制成。该半导体材料为碲化铋，一种铋、碲、硒和锑的四元合金，该合金中掺入了杂质并且经过处理以生成特征为定向多晶的半导体。把电学上串联连接且热法上并联连接的电偶集成为组件。把该组件封装在镀金的陶瓷平板之间，从而在压缩中的高机械强度下提供最佳的电绝缘和热传导。该组件可以并联安装以提高传热效果或者可以按多级串联堆积以实现高的温度差。传送电流穿过热泵会造成跨热电偶的温度差，其最高的额定值为70℃或者更高。

在冷却后，红血球-IHP悬浮液进入电穿孔室72，在该室中把来自脉冲发生器75的电脉冲施加到红血球-IHP悬浮液上，从而造成在红血球的细胞膜内部形成开口。选择性地，当室72中充满红血球-IHP悬浮液时，一个自动检测系统会开启脉冲发生器75。每当室72中充满未被包裹的细胞时，便向该悬浮液施加电脉冲。当该设备的操作为静态时，即当处理单一、不连续批次的细胞时，可以采用常规的电穿孔室。在本发明的一个优选的实施方案中采用了一种流式电穿孔室。在一个实施方案中，流式电穿孔室72是由纯的聚氯乙烯构成的并且含有两个相反的电极，其空间距离相距7mm。电极间的距离随着流量与场强而变化。该流式电穿孔室72优选是易于处理的。电穿孔室也可以由 polysulfone 制成，它优选用于某种灭菌过程，比如高压灭菌。下面提供了该流式电穿孔室的结构和构造的详细描述。

红血球-IHP 悬浮液在电穿孔室 72 的两个电极之间穿过。当未处理的细胞悬浮液进入室 72 时，将产生一个 1 到 3KV/cm 的场强并且该场强持续 1 到 4 毫秒，而对于 1.8 毫升的室优选为 2 毫秒。单位体积的 IHP-红血球优选经历三个高压脉冲，其中每个脉冲的场强大约为 2600 到 3200V/cm。脉冲电流穿过细胞膜使细胞膜电击穿，在膜上产生微孔。然后 IHP 通过这些微孔扩散到细胞中。

电穿孔之后，红血球-IHP 悬浮液进入温育室 78，在该室中悬浮液在室温下温育，温育时间在大约 15 分钟到 120 分钟之间，优选的温育时间为 30 到 60 分钟。红血球-IHP 悬浮液可以选择性地在温度大约为 37 °C 下温育大约 5 分钟，并且在室温下至少为 15 分钟。温育室可以选择性地被加热装置 80 包围。例如，加热装置可以是水浴或热电热泵。

温育室 78 可以选择性地包括重新填缝缓冲溶液，该缓冲溶液辅助重新填缝和重新构建红血球。优选的重新填缝缓冲溶液的组成在下表 B 中提供。

表 B
重新填缝缓冲溶液

I. 组成	
氯化钠	150mMol
氯化钾	8mMol
磷酸钠	6mMol
硫酸镁	2mMol
葡萄糖	10mMol
腺嘌呤	1mMol
肌醇	1mMol
青霉素 G	500 单位/毫升
氯霉素	0.1 毫克/毫升

II. 添加剂	
BSA	3.5 %
氯化钙	2mMol

在本发明优选的实施方案中不使用重新填缝缓冲溶液。

温育之后，打开阀门 51，启动泵 40，红血球-IHP 悬浮液从温育室 78 返回到分离与洗涤辊筒 44。通过离心将过量的 IHP 溶液从红血球悬浮液中除去。废 IHP 溶液导入废液贮槽 57。然后打开阀门 33，15 和 36 让 1 体积的稀释液进入血液分离与洗涤辊筒 44。本发明可以使用的稀释液如表 C 所示。

表 C
稀释缓冲溶液

I. 组成	
氯化钠	0.9 %
氯化镁	2mM
氯化钙	2mM
硫酸镁	2mMol
葡萄糖	10mMol
0.1 % 青霉素(可替换的)	0.1 %
0.1 % 链霉素(可替换的)	0.1 %

然后离心红血球-IHP 悬浮液，通过阀门 54 将上清液排入废贮槽 57，红血球则留在血液分离与洗涤辊筒 44 中。从稀释液贮槽 30 把含盐的缓冲溶液加入到改良的红血球中。洗涤该细胞并且在离心后弃去上清液。如果需要可以重复该洗涤过程。

当从分离与洗涤辊筒中除去废物时，该废物可以选择性地通过一个杂质检测器 46 以检测废液中任何游离的 IHP 从而来证实外源的、未包裹的 IHP 已从改良的红血球中除去。杂质检测器系统依赖于洗涤缓冲溶液的光学变化。改良的红血球经洗涤和离心之后，上清液在废液贮槽 57 存储之前先通过杂质检测器 64。如果外源的、未包裹的 IHP 存留在洗涤缓冲溶液中，则弃去的溶液会是混浊的。浊度是由于 IHP 与洗涤缓冲溶液的一个组分钙的反应造成的。杂质检测器 46 使用光学检测系统。优选地，光源为 LED，检

测器为光电二极管。光电二极管的电压表明洗涤溶液中 IHP 的数量。杂质检测器 46 是可选择的。

洗涤之后，IHP-红血球产品可以选择性地与保留在贮槽 89 中的血浆和白血球重新构建。处理过的红血球可以收集在回注(reinjection)袋中或者在防腐介质中或者在病人自身的血浆中。

得到的荷载 IHP 的红血球可以直接返回到病人体内或可以储存起来以备后用。在正常的储存期内红血球中的 IHP 不会释放出来。

本发明的一个优选的实施方案参照图 2 进行描述，该图示意性地说明了本发明的连续流动的电穿孔设备的结构。而且该设备的操作方法参照其优选的使用方法(即，通过电穿孔在红血球中包裹血红蛋白别构剂的方法)加以描述。应当了解到可以对该设备进行改造以适用于其它的细胞群或泡囊以及其它生物活性物质。此外可以对该设备进行改造以适于其它包裹方法。

按照本发明，完整血液的样品在入口 11 送入到电穿孔系统 10 中。打开阀门 12 将样品送入系统 10。同时，打开阀门 25 并启动泵 22 以便从抗凝剂贮槽 27 中引入抗凝剂。打开阀门 15 和 36 并且启动泵 40。

抗凝剂和完整血液的混合物通过过滤器 18 和压力测定系统 19，在血液分离与洗涤辊筒 44 中收集，其中当开启泵 40 的时候该辊筒也被启动。当血液分离与洗涤辊筒 44 中充满红血球时传感器会显示。

当泵 40 沿顺时针方向转动时，启动血液分离与洗涤辊筒 44 并且离心抗凝剂和完整血液的悬浮液以分离血浆、白血球、红血球和废物。打开阀门 87 让血浆和白血球进入血浆贮槽 89。

然后选择性地将存留在分离与洗涤辊筒 44 中的细胞洗涤和离心。打开阀门 33, 35, 15 和 36 从而让来自稀释液贮槽 30 的盐水缓冲液进入含有红血球的血液分离与洗涤辊筒 44 中。关闭阀门 12，泵 40 维持转动。

在洗涤过程中，打开阀门 54 让废水进入废水贮槽 57。废水又一次储存在废水贮槽 57 中，而红血球留在血液分离与洗涤辊筒 44 中。如有需要，重复该洗涤过程。可以选择性地把杂质检测器安装在分离与洗涤辊筒 44 和废水贮槽 57 之间以控制洗涤过程。

红血球分离之后，将泵 40 反转，关闭泵 22，关闭阀门 12、15、33、

35、36、25、87和54，打开阀门97。如果洗涤细胞的话，预先关闭泵22，阀门12和25则已经关闭。从IHP贮槽50中抽出IHP溶液送入含有红血球的分离与洗涤辊筒44中。在该辊筒中，红血球与IHP混合形成悬浮液。

溶液中IHP的优选浓度在大约10mMol到100mMol之间，更优选的浓度在大约23mMol到35mMol之间，最优选的浓度为35mMol。优选的IHP溶液含有如下浓度的下列化合物：

35mM 中和的IHP(六钠盐) (Matreya 化学公司)

5mM KCl

1.0mM $MgCl_2$

135mM 蔗糖

Aldrich 化学公司的IHP不含任何氯化钠和最小量的其它电解质，因此没有显著降低该溶液的电阻率。应当了解到在本发明中可以使用其它高电阻的溶液并且溶液的组分不是关键的。只要溶液的渗透特性不破坏细胞，如红血球，并且溶液的电阻率高，它就适于在本发明中使用。测定了几种组合物的电阻率，结果如图22所示。“CBR流体”在表A中列出。

悬浮液的血细胞比容优选在大约30到60之间，最优选的血细胞比容大约为40。将泵40设计成为能够抽出红血球和IHP溶液并且可以进行调整以便能够预先确定进入冷却旋管68中的最终的血细胞比容。

红血球和IHP溶液结合之后，再次反转泵40，关闭阀门97，打开阀门64。然后将红血球-IHP悬浮液抽入热电冷却旋管68中。一种来自血液加热装置的血袋(blood bag)，例如由Baxter保健公司所生产的Fenwal[®]血液加热装置中提供的血袋可以用作冷却旋管68。当红血球-IHP悬浮液通过位于冷却贮槽69中的冷却旋管68时，冷却悬浮液至温度大约介于1℃到12℃之间，优选大约为4℃。可以选择性地把一个泵加入到处于冷却旋管68和冷却贮槽69以及电穿孔室之间的设备处，从而确保恒定的流速并补偿当冷却旋管68充满时发生的体积波动。

选择性地可以省去预冷却步骤并且在混合后把红血球-IHP悬浮液直接引入电穿孔室72。在这种情况下，可以从连续流式包裹设备10中省去冷却旋管68和冷却贮槽69。如果电穿孔室的温度足够冷以维持该细胞悬浮液处于4℃的话，在电穿孔前可以不必进行冷却。

冷却后，红血球-IHP 悬浮液进入电穿孔室 72。室 72 的温度维持在大约 4℃。当红血球-IHP 悬浮液通过流式电穿孔室 72 时，把来自脉冲发生器 75 的电脉冲加到悬浮液上从而引起红血球的细胞膜上产生孔。

红血球-IHP 悬浮液在电穿孔室 72 的两个电极间通过。图 3 到图 10 描述了该电穿孔室。在本发明优选的实施方案中，当未处理的细胞的悬浮液进入室 72 时，单位体积的 IHP-红血球悬浮液将经历大约三个高压脉冲或脉冲串，其中每个脉冲场强大约为 2600 到 3200V/cm。已经证实为了把 IHP 引入血液，使用一串脉冲代替单个脉冲来向红血球运送 IHP 会更有效。在每个脉冲串中最佳的脉冲数在大约 10 个脉冲到 512 个脉冲之间，优选的数目为大约 312 个脉冲。在脉冲或脉冲串之间改变电场的极性也是有好处的。图 28 中显示出一个具有代表性的两个脉冲串。在细胞膜两侧产生的电荷导致细胞膜击穿，从而在细胞膜上产生孔。然后 IHP 通过这些孔扩散到细胞中。此外，尽管不一定需要有如下的假设，人们确信 IHP 实际上是在电场的作用下进入细胞的。

在电穿孔过程中，产生一个 1 到 3KV/cm 的电场并且维持 1 到 4 毫秒。优选的脉冲长度为 3 到 4 毫秒，最佳选的脉冲长度为 2 毫秒。脉冲长度或脉冲串长度定义为 $1/e$ 。在大约 10.6 毫升/分钟的流速下，优选的脉冲数为 3 到 5，优选的脉冲速率为 0.29Hz。场强定义为两个电极间的电压与距离之比。两个电极之间的距离以厘米为单位进行测量。优选的电参数如下：

脉冲长度或脉冲串长度 = 1.5 ~ 2.5 毫秒

场强 = 2.7 ~ 3KV/cm

电穿孔室选择性地可以是一个传感器，它在一定意义上可以监测穿过电穿孔室的细胞溶液的电阻率。当细胞溶液的电阻率变化时，存在一个可以调整细胞脉冲的反馈电路以维持最佳的电穿孔效率。例如，当在 IHP 溶液中电穿孔血液时，不同的血液样品可以有不同的电阻率。通过监测血液的电阻率，可以在对电阻率测量的基础上施加最佳的脉冲强度和脉冲时间。此外，如果电穿孔室引入气泡，由于电阻率的变化，该反馈电路会检测到气泡的存在，并且关闭脉冲直到气泡离开该室。

电穿孔后，红血球-IHP 悬浮液进入温育室 78，在该室中于室温下温育悬浮液大约 10 分钟到 120 分钟，其中优选的温育时间为 30 分钟。红血球

-IHP 悬浮液可以选择性地在大约 37 °C 下温育大约 5 分钟，在室温下至少温育 15 分钟。温育室 78 可以由加热装置 80 所包围。在实施本发明时，可以使用任何的加热装置。优选的加热装置 80 为水浴或电热泵。

温育室 78 可以选择性地含有一种可以协助红血球重新填缝和重新构建的重新填缝缓冲液。在本发明优选的实施方案中，则不使用重新填缝缓冲液。

温育后，当打开阀门 51 和启动泵 40 时，红血球-IHP 悬浮液返回血液分离与洗涤辊筒 44 中。通过离心将过量的 IHP 溶液从红血球悬浮液中分离出来。废 IHP 溶液导入废液贮槽 57。然后打开阀门 33、37、15 和 36 让来自贮槽 31 的一体积的在后 (post) 洗涤溶液进入血液分离与洗涤辊筒 44 中。在本发明优选的实施方案中，在后洗涤溶液含有 0.9 % NaCl 溶液，该溶液包括 2.0mM CaCl_2 和 2.0mM MgCl_2 。可以使用任何生理盐水。

加入在后洗涤溶液后，离心红血球-IHP 悬浮液，并通过阀门 54 将上清液排入废物贮槽 57 中，同时把红血球留在血液分离与洗涤辊筒 44 中。重复该洗涤过程直到除去所有的未包裹的 IHP。

当废物从分离与洗涤辊筒 44 中除去时，它可以选择性地通过一个杂质检测器 46 以检测该废液中的任何游离的 IHP，从而证实外源的、未包裹的 IHP 已从改良的红血球中除去。杂质检测器是可选择的。

洗涤后，含 IHP 的红血球可以与储存在贮槽 89 中的血浆和白血球重新构建。启动泵 40 并且打开阀门 87、36 和 92。把改良的红血球、血浆和白血球用泵送到贮槽 96。可以在贮槽 96 和阀门 92 之间安装一个过滤器以除去来自于重新构建的改良血液中的任何聚集体或其它杂质。

按照本发明的方法得到的荷载 IHP 的红血球可以直接送回病人体内或将该红血球储存以备后用。在正常的储存期内，红血球中的 IHP 不会释放。

可以预料可以对本发明的连续流式包裹设备进行改进以适用于其它的包裹方法。

而且，可以预料可以对该连续流式包裹设备进行改进以便处理各种各样的细胞群。而且，该设备还可以用于在人造泡囊中包裹生物活性物质。

也可以预料本发明的连续流式包裹设备可以用于包裹很宽范围的生物活性物质。

流式电穿孔室

在电穿孔过程中，掺入 IHP 的速率线性依赖于加到细胞上的电压。一般说来，电压越高，包裹的 IHP 越多。但是，细胞的裂解也会增加并且细胞的存活降低。电穿孔系统的效率可以通过电穿孔后细胞的存活来加以判断。电脉冲的振幅和持续时间造成细胞膜的电击穿并在平行于电场的极帽 (pole caps) 上产生微孔。因此，在设计一个电穿孔系统需要考虑的因素包括场强、脉冲长度和脉冲数。

一个理想的电穿孔目标的形状象一个球，以便它的方向不影响所施加的电场的效率。当目标是球形的时候，采用一个场强在阈值以上的单个脉冲可以击穿 100 % 的目标。红血球是圆盘形的。由于在电穿孔室中它们的形状和方向，所以在单个脉冲过程中只有大约 40 % 的细胞被电击穿。为了击穿另外的 60 %，可以增加场强。这将以正对电场的方向增加红血球的受力，并且导致细胞的存活率较低。

为了在减少细胞裂解和死亡发生的同时达到更有效的包裹，研制了一种使用持续时间短的多级脉冲的流式电穿孔室。在稳定的通过速率和稳定的场电压下，可以测定多个脉冲将在最少的 2 小时至 24 小时完全裂解下掺入最大量的 IHP。多脉冲系统可以在不增加场强的情况下提高细胞的存活率。当使用多脉冲系统时，细胞的方向不象使用单脉冲系统时那样苛刻。较低的场强对红血球更温和。在多脉冲系统中更易于电击穿每个细胞，这是因为红血球通过该室的流速与电穿孔脉冲之间的同步 (timing)，以及细胞的方向不象在单个脉冲系统中那样关键。与单个脉冲方法相比，流动多个脉冲电穿孔系统也增加了红血球的短期和长期的存活率。

图 11 到 13 显示了在静止或流动条件下，不同的场强对在一定的氧压力范围内包裹 IHP 的红血球氧合作用百分数的影响；对包裹 IHP 的红血球 P_{50} 值 (对两个浓度的 IHP 溶液进行了对比) 的影响；以及对经历电穿孔的红血球存活率的影响。所有的数据在电穿孔后 24 小时获得。结果表明多脉冲在相对低的场强下产生最佳的包裹结果。

一个在电穿孔过程中优选冷却的电穿孔室在恒定的温度下保存红血球，从而增加其存活率。这可以通过排走在电穿孔过程中由电脉冲产生的

过多的热量来实现。过多的热量可以通过冷却电极或冷却整个流式电穿孔室来排除。按照本发明的一个实施方案，电极进行自身冷却。

在电穿孔过程中，用泵将血液通过入口送入电穿孔室，并且当红血球穿过该室时它们将经历一系列电脉冲。在该室的另一侧红血球流出。该室可以由任意一种绝缘材料制成，包括陶瓷，聚四氟乙烯，有机玻璃，玻璃，塑料，硅，橡胶或其它合成材料，但并不只局限于此。该室优选由玻璃或聚砷组成。不管该室的组成如何，室的内表面应该是光滑的以减少流体通过时的湍流。该室的外壳应该是不导电的并且是生物惰性的。在商业使用中，可以预料该室应是易处理的。

在本发明的一个优选的实施方案中，组成电穿孔设备的一部分的电极可以由任意一种导电或导热的中空的原材料(stock material)来制造，包括黄铜、不锈钢、镀金不锈钢、镀金玻璃、镀金塑料或含塑料的金属，但并不局限于此。电极的表面优选是镀金的。镀金起到消除氧化作用以及减少血红蛋白和其它细胞粒子在电极聚集的作用。电极的表面应该是光滑的。

电极可以是中空的，从而可以通过液体或气体进行冷却或者电极可以是固态的，从而可以采用热电或任何其它类型的传导来冷却。除了冷却电极以外，也可以通过冷却电穿孔室自身来实现冷却。

电穿孔室优选是易处理的。下文提供了本发明电穿孔室的三个实施方案的详细描述。

在一个实施方案中，流式电穿孔室由纯的聚氯乙烯构成，并且含有两个间距大约7毫米的相对电极。该电穿孔室是从加里弗尼亚圣地亚哥的BTX电子公司得到的一个室的改进。但是，当连续使用该电穿孔室时，它会过热并且经该设备处理过的细胞分存活率随时间而降低。为了纠正以连续流动方式使用该设备时发生的过热问题，设计了一种连续流式电穿孔室。下文提供了连续流式电穿孔室结构的详细描述。

图3到图8提供了本发明流式电穿孔室72的一个实施方案。从图3可以看出，流式电穿孔室72包括含有两个电极102的外壳100，这两个电极插在电穿孔室72的外壳100的相对两侧。外壳100包括位于一端的一个入口通道104和位于另一端的出口通道106。入口通道104和出口通道106

分别包括连接管 108 和 109，其中优选 Luer 类插入配件(male Luer variety)。连接管 108 和 109 是中空的并且形成进入电穿孔室 72 内部的入口通道 104 和出口通道 106。

从图 4 和 5 可以看出，内室 110 占据了外壳 100 大部分的长度并且其尺寸以安装两个电极 102 为准。内室 110 包括用于安装电极 102 内缘的倾斜表面。因此通过电极 102 的内表面和外壳 100 的内表面形成内室 110。内室 110 与入口通道 104 和出口通道 106 相接。

从图 7 和 8 可以看出，图 3 到图 6 的电穿孔室 72 的电极 102 由平的、细长的中空壳构成。电极 102 包括位于末端的冷却入口 112 和冷却出口 114。如上所述，电极 102 的后表面或图 7 中朝左的表面紧贴着外壳 100 的倾斜表面 111 安装。

将电穿孔室 72 设计成为可以让待经历电穿孔的细胞悬浮液通过入口 104 进入电穿孔室 72 并且扩充至充满内室 110。当红血球悬浮液流经内室 110 时，在内室 110 的宽度两侧施加一个脉冲或电荷。

为了在电穿孔过程中维持相对恒定的温度，用泵将冷却液体或冷却气体从冷却入口 112 送入并从冷却出口 114 流出以便维持电极 102 大约为 4℃。

图 9 和 10 显示了流式电穿孔室 172 的第二个实施方案。从图 9 和 10 中可以看出，流式电穿孔室 172 包括一个中空的基本上呈长方形的外壳 200。两个电极 202 直接彼此相对地插入外壳 200 的内部，紧贴外壳 200 的壁进行安装。流式电穿孔室 172 还包括位于外壳 200 一端的入口通道 204 和位于另一端的出口通道 206。入口通道 204 和出口通道 206 包括连接管 208 和 209，该连接管通过管道 216 连接到细胞悬浮液供料槽(supply)，该供料槽向电穿孔室 172 提供细胞悬浮液，即 IHP-红血球悬浮液。连接管 208 和 209 以及入口 204 和出口 206 起到把细胞悬浮液导入和导出外壳 200 的作用。

从图 10 中可以看出，入口通道 204 的一端和出口通道 206 的一端延伸到外壳 200 的内部形成内室 210。因此，内室 210 是由电极 202 的内表面、外壳 200 的内表面以及入口通道 204 和出口通道 206 的内表面形成的。

从图 9 和 10 中可以看出，流式电穿孔室 172 的电极 202 包括平的、细

长的、中空壳。电极 202 包括位于其末端的冷却入口 212 和冷却出口 214，通过它们可以抽吸气体或液体穿过电极 202 以便在电穿孔过程中维持恒定的温度。通过电缆 220 把电极 202 连接到一个脉冲发生器上。

正如上面所述的室，将图 9 和 10 的电穿孔室 172 设计成为可以让待经历电穿孔的悬浮液通过液体入口 204 进入电穿孔室 172 并且扩充至充满内室 210。当红细胞悬浮液流经内室 210 时，在两个电极 202 之间、穿过内室 210 的宽度两侧施加一个脉冲或电荷。为了在电穿孔过程中维持相对恒定的温度，用泵将冷却液体或冷却气体通过连接管 208 送入电极 202 的冷却入口 212 并从冷却出口 214 经连接管 209 抽出，从而维持电极 202 大约为 4℃。入口通道 204，出口通道 206 以及连接管 208 和 209 可以制成一个固化的一体的玻璃部件，而不是分开的部件。

可以预料流式电穿孔室 172 可以由拉制的(drawn)玻璃或任何其它高度抛光的材料制造。优选电穿孔室 172 的内表面尽可能的光滑以减少表面湍流的产生。拉制的玻璃的成分能很好地符合完美的表面抛光的要求。而且，上述成分稳定并且对血液组分呈惰性。上述成分也相当便宜，这对一种易于处理的电穿孔室正是所需的。

电极也可以由拉制的玻璃组成并采用胶态金进行电镀。电极表面也应该是高度抛光的，高度传导的，但生物上呈惰性。金属电镀品持久且便宜。流体的连接可以使用通常可得到的部件来实现。

流式电穿孔室或者可以作为整个流式包裹设备的一部分而进行构造或者也可以作为单独设备而构造。为了包裹特殊的细胞群，可以把流式电穿孔设备连接到一个可通过商业途径得到的血浆去除机器上。例如，通过电子的或移动的硬件或软件，可以把流式电穿孔设备连接到可以通过商业途径得到的血浆去除设备上。通过 PC 程序驱动(driven)的一个夹紧阀阵列(array)和控制器也可以选择性地用于控制流式电穿孔设备。类似地，电源能够建立起运转流式电穿孔室或流式包裹设备所需的能级。

现在参照图 14-20 描述连续流式电穿孔室的第三个实施方案。首先参照图 14-16，支承构件 300 由柔韧的硅橡胶构成。支承结构 300 基本上呈钻石形并且包括一个上端 301 和一个下端 302。支承结构 300 的主要部分具有一个在其上所形成的网格状的“蛋奶烘饼”型式，该支承结构由较厚

的肋片 303(rib section)和介于肋片 303 之间较薄的肋片 304。沿支承结构 300 的边缘,提供了许多薄片 305,每个薄片上均有一个穿过该薄片的孔 306。

通道 308 在支承结构的上端 301 和下端 302 之间延伸并且处在支承结构 300 的长轴上。通道 308 包括由底座 314 连接的相对的通道壁 310, 312。在支承结构 300 的上端 301 处,通道 308 开口到圆形的孔穴 318。在圆形孔穴 318 的中央形成一个孔 320。在圆形孔穴 318 的上端设置一个出口孔 322。通过类似的方式,通道 308 开口到在支承结构 300 下端 302 上以形成的圆形孔穴 324。在孔穴 324 的中央形成一个穿过支承结构的孔 326,并且在圆形孔穴 324 下上端设置一个入口孔 328。

一对由导电的金属带(tape)或薄片(foil)构成的连续带状电极 330A、330B 位于支承结构 300 上。每个电极 330A、330B 都有一部分布置在通道 308 内并且基本上通过通道 308 的整个长度。也许最好可以在图 16 中看出,把电极 330A、330B 安装在由通道 308 的侧壁 310, 312 所形成的相对的凹入部分 332 上。靠近通道 308 的上端和下端,每个连续带状电极 330A、330B 都通过一个在通道壁上形成的紧密配合的狭缝离开通道 308。然后连续带状电极 330A、330B 向外弯曲,基本上平行于支承结构 300 的圆周延伸并且从该处向内彼此隔开。为了如下所述的目的,沿着支承结构 300 的中线并靠近其外缘,在每个连续带状电极 330A、330B 上设置一个松弛(slack)部分 334。

在通道 308 的每一侧并且直接靠近通道处,形成许多通常为长方形的孔 340。正如下文将要更详细地解释,设置孔 340 是出于冷却目的而选择性地容纳 Peltier 热电元件。在紧靠通道 308 上端和下端的每一侧上设置圆孔 342,如下所述,可以调节该孔来安装用于拉紧连续带状电极 330A、330B 的卷筒(capstan)。正如以下将要更详细描述,沿着支承结构 300 的中线并靠近其边缘处,可以调节一对孔 344 来安装用于给电极 330A、330B 充电的穿过该孔的电接触。

现在参照图 17,支承构件 300 安装到透明的聚碳酸酯框架 350 上。框架 350 包括一个平面前壁 352。内侧壁 354 从平面前壁 352 的侧棱向后延伸。在两个内侧壁 354 之间形成一个向后的开放通道 356。在内侧壁 354

的后缘, 一对后壁 358 向外延伸。一对外侧壁 360 从后壁 358 的外缘向前延伸。在外侧壁 360 和内侧壁 354 之间形成一个向前开放的通道 362。在每个向前开放的通道 362 上可移动安装的悬杆 363 提供了一种用于在通道内悬挂流体储存袋的方便的装置。

支承结构 300 安装在聚碳酸酯框架 350 的前壁的后表面上。支承结构 300 附着结合在框架 350 上以便框架 350 的前壁 352 密封住在支承结构 300 的表面形成的通道 308 开放的上端。这样密封, 通道 308 便限定了一个流体的通道或“流动小室” 364。此外, 支承结构 300 以及框架 350 与之相应分部分限定了电穿孔室 366。

进一步参照图 17, 支承柱 370 具有一个通常为长方形的横截面。在支承柱 370 的前面 371 处形成一个与支承结构 300 的形状和深度一致的孔穴 372。分别位于每个侧面并且沿着孔穴 372 的长轴处有许多碲化铋的 Peltier 热电元件 374 固定安装在该孔穴中并且从孔穴 372 的底部向前伸出。Peltier 热电元件 374 与安装在支承柱 370 内部的一个散热器 375 有热联系。安装在靠近支承柱 370 部分的电扇 376 产生通过支承柱的空氣的流动以便从散热器 375 散热。

卷筒 377 靠近孔穴 372 的上端和下端并且分别位于中线的两侧。靠近孔穴 372 的外缘并且位于沿着孔穴短轴的是一对电极接头 378。恰好位于孔穴 372 周边内的是 8 个定位针(locator pin) 379, 其中两个定位针 379 位于沿着钻石形孔穴的 4 个壁的每个壁上。在孔穴 372 的上端和下端并且位于孔穴长轴上的是一对中空的, 多孔的, 聚合物圆柱体 380。圆柱体 380 优选由含有允许气体而不是液体通过大小的孔的惰性泡沫聚乙烯(如 Porex) 形成。正如在下文将要更详细地描述, 这些透气而不透液的圆柱体起到一个从该柱体上通过的流体中除去气泡的装置的作用。

聚碳酸酯框架 350 的大小以支承柱 370 整齐地安装在框架向后的开放通道 356 的内部为准。当框架 350 定位在支承柱 370 上时, 安装在框架 350 的前壁 352 背面的支承结构 300 恰好装配在支承柱 370 的前面 371 上形成的孔穴 372 内。架子 381 位于恰好在孔穴 372 下面的支承柱 370 的前面 371 上, 以支承聚碳酸酯框架 350 的下缘。

如图 19 所示, 通过将框架 350 如此安装到支承柱 370 上, 与孔穴 372

和支承柱 370 有关的各种元件同支承结构 300 共同地啮合在一起。更具体地讲, 热电冷却片 374 通过在支承结构 300 上的孔 340 伸出并且接触通道 308 的壁。卷筒 377 穿过在支承结构 300 的上端和下端的孔 342。电极接头 378 穿过在支承结构 300 上的孔 344 伸出。定位针 379 布置在支承结构 300 的薄片 305 上相应的孔 306 内。透气而不透液的圆柱体 380 穿过在支承结构 300 的上端 301 上的孔穴 318 里的孔 320 和下端 302 上的孔穴 324 里的孔 326。

现在参照图 20, 将至少一个用于支承每个电极 330A、330B 的卷筒 377 通过如拉紧装置 382 拉紧以维持连续带状电极处于拉紧状态。如图 20 中也可以看到, 每个电极接头 378 有一个在其表面上形成的狭槽 383, 并且与连续带状电极 330A 或 330B 有关的松弛部分 334 通过该狭槽。运转与每个电极接头 378 以传动啮合(driving engagement)的电动机 384 以旋转电极接头, 从而绕着一部分接头旋转电极 330A 或 330B 并且拉紧松弛部分。该旋转动作起着增加电极接头 378 及相关的电极 330A 或 330B 之间表面接触的附加作用, 从而增强了同电极的电接触。

位于流动小室 364 上端和下端(图 20 仅显示了它的上端)的透气而不透液的圆柱体 380 与真空源通过连接管 388 和管道 390 以流体发生联系。图 20 也显示出, 散热器 375 驱散由热电冷却片 374 收集的热量。

控制流体沿着适当的流道进出流动小室 364 的流动是通过安装在支承柱 350 上的蠕动泵装置 392 和电磁激励的夹紧阀 394 来实现的。泵装置 392 和夹紧阀 394 在可以在操作处与之相连的计算机装置(未显示出)的适当算法的控制下进行操作。

把冷却后的板 396 安装在支承柱 370 的侧面。使夹在框架 350 的槽 362 中的冷却袋 398 与板 396 紧密接触卡在一起, 以便冷却电穿孔后处理过的流体。取决于环境和待处理的生物物质, 可以选择性地加热板 396 以便在高于室温的预定温度下维持袋 398 的内含物。

图 21 说明了一个配套的电穿孔设备 400。设备 400 包括一个起到外壳和支承结构作用的手推车 402。把带有电穿孔室 366 的支承柱 370 安装到该手推车上并且由此向上延伸。手推车 402 具有一个底盘结构 404, 该结构装配有轮 406 以加速手推车 402 从一个位置运送到另一个位置。安装到

底盘结构 404 上的是电源电容器 408。电源散热器 410 与电源电容器 408 进行热交换以驱散由电源电容器所产生的热量。

把电路板测定装置 412 也安装在底盘结构 404 内。通过安装在底盘结构 404 内部、靠近电路板测定装置的电源电路板 414 来驱动电路板测定装置 412。与电源电路板 414 进行热交换的电源散热器 416 驱散由电源电路板所产生的热量。安装在底盘结构 404 的前挡板 420 下端的冷却风扇 418 从底盘结构中抽出空气以便从散热器 410, 416 中带走热量。

把在操作上与电路板测定装置 412 有关的系统状态显示器 422 安装在手推车 402 的前挡板 420 上。把用于设置电路板测定装置 412 的不同参数的控制开关 424 安装到位于系统状态显示器 422 之下的手推车 402 的前挡板 420 上。

安装在手推车 402 的上面板 428 内部的是离心辊筒 430。安装在底盘结构 404 中的离心驱动电动机 432 与离心辊筒 430 以传动啮合。离心辊筒 430 包括一个旋转连接管 434, 通过该连接管把血液输入离心辊筒。

现在参考图 21 来描述在含有第三个具体的电穿孔室 366 的配套的电穿孔设备 400 中对生物粒子的处理。把血液供应袋 450 悬挂在位于框架 350 的槽 362 内部的悬杆 363 上。管道 452 输送血液至离心辊筒 430, 其中血液是通过一个旋转连接管 434 进入离心辊筒的。离心血液以便从血浆、白血球和废物中分离出红血球。然后把红血球和待包裹的物质混合。经管道 454 运送该混合物并且将其引入位于容器 364 下端的入口 328。使该混合物在电极 330A 和 330B 之间向上流动, 穿过流动小室 364。该电极按照如上所述的第二个实施方案中的脉冲方式充电。通过位于该容器的上端和下端的透气、而不透液的圆柱体 380 可以除去混合物中会引起电解的气体。处理后的混合物从位于该容器上端的出口 324 流出, 出口管 456 运送处理后的混合物到一个冷却袋 460 中, 该冷却袋悬挂在位于框架 350 的另一个槽 362 内部的悬杆 363 上且与冷却后的板 396 接触。然后把该流体运送到一个悬挂在靠近冷却袋 460 的悬杆 363 上的后处理的冷却与储存袋 462 中。

泵的速度(以及由此的流速), 阀门操作, 离心操作, Peltier 热电元件的操作以及电极的脉冲充电均受电路板测定装置 412 的控制。理想化的离心辊筒 430 的处理速率应与流动小室 364 的流速相匹配。但是, 为了适

应任何不匹配的情况，可以选择性地在离心辊筒 430 和流动小室 364 之间设置一个贮槽。因此，如果离心辊筒 430 处理血液比流动小室 364 所能处理的更迅速时，该贮槽将储存任何过剩的混合物直至流动小室能够“跟上步伐”。与此相仿，如果离心辊筒 430 处理血液比流动小室 364 所能处理的更慢时，电路板测定装置 412 能够在一开始便在贮槽中积累混合物。然后当离心辊筒 430 已经处理了足够体积的血液时，可以把该混合物从贮槽运送到流动小室 364 中。当贮槽中混合物的体积已经用尽时，该离心辊筒也将完成所需量的血液的处理。

上述电穿孔设备 400 的一个任选的特征为一连串可以进行单独控制的 Peltier 热-电冷却片 374，从而在处于沿着流动小室 364 的一个位置上的冷却片可以比处于沿着流动小室 364 的其它位置上的其它冷却片提供更高或者更低程度的冷却。由于当生物粒子沿着流动小室 364 移动时正在被加热，因此在较靠近流动小室 364 的出料口处可能比靠近进料口处需要更多的冷却。只要对不同热-电冷却片 374 的单独控制满足适应上述变化即可。不同的热-电冷却片 374 或者可以通过在沿着流动小室的不同位置处放置热传感器、向电路板测定装置 412 输入感受到的温度以及控制与感受到的温度相对应的不同的热-电冷却片来进行控制。或者，不同的热-电冷却片 374 可以根据生物粒子沿着流动小室的预定的“平均”温度变化来进行控制。用于控制不同的热-电冷却片 374 的其它方法是本领域技术人员所能想到的。

正如那些熟悉本领域的技术人员所了解的，存在几个无需重新使用原电穿孔室的理由。首先，可能会把存在传染成分的可能性传递到其他病人体内。而且，由于电极表面两端的高电压提高了电弧放电的潜能，所以该电极表面的电效能会减少。为了防止这些以及其它的问题，第三个公开的实施方案的一个特征为提供了一种用于确保该室不再重新使用的装置。在该工艺的末尾以及在框架 350 从支承柱 370 移走之前，处于和电极接头 378 以传动啮合的电动机 384 被自动驱动而过度-旋转，在超出抗拉强度的情况下拉伸电极 330A，330B 并且拉断电极。因此随着电极 330A，330B 的拉断，不可能再重新使用该室。

一种已知与电穿孔设备有关的危险为由电解引起的气体的无意生产。

已知由这些气体多余的积累所造成的过压缩会导致爆炸。为了减少这种可能性，本发明使用了一种由柔软的硅橡胶在三侧所限定的流动小室 364。在瞬时过压缩的情况下，支承结构 300 的弹性会适应流动小室 364 的膨胀，因而减少爆炸的可能性。此外，流动小室 364 被紧紧地夹在支承柱 370 和聚碳酸酯框架 350 之间，从而进一步提供了保护以防任何可能的爆炸。

当参考已公开的实施方案来具体地描述本发明时，应当了解到在本发明附加的权利要求中所描述的精神和范围内可以实现许多变化和改进。

细胞洗涤设备

图 24 是使用过滤透析、优选逆流过滤透析的细胞洗涤设备 500 的剖视示意图。该完整设备具有完全包含了其内部部件的顶面和侧壁。本发明的另一个方面是细胞洗涤设备，该设备采用了穿过多孔膜的逆流透析以除去 IHP 溶液，并代之以一种与红血球相容的溶液，该溶液包括含有生理盐水，但并不只局限于此。如图 24 所示，细胞洗涤设备 500 包括含有已被电穿孔的细胞的第一贮槽 505。在 IHP 存在下已被电穿孔的细胞中，这些细胞将穿过电穿孔室 72 并且处于含有过剩的 IHP 的溶液中。然后通过泵 510 按箭头方向把电穿孔后的细胞抽过管道 515。在位于细胞洗涤设备外壳 523 上的管道入口 520 处，把细胞悬浮液引入细胞洗涤设备 500。处于设备 500 内部的细胞通道是由一个细胞板 526 所限定的，该细胞板具有限定该细胞悬浮液流经的迷宫的肋板 525。

一个优选的迷宫显示在图 25 中，该图显示了细胞板 526 的侧视图并显示出位于限定迷宫的板上的肋板。挤压细胞板 526 使之贴着半透膜 575 的第一侧壁 577，其中压力要足够大以便细胞沿着由肋板 525 所限定的迷宫而受力。应当了解到由肋板 525 所限定的迷宫可以是任意形式的，只要细胞悬浮液与半透膜 575 接触即可。因此，当细胞悬浮液流经细胞洗涤设备 500 时，该悬浮液与半透膜 575 之间可以紧密接触。

半透膜 575 具有足够大的孔以使溶液和该溶液中任意的溶解组分透过膜，但却不能使溶液中的细胞透过膜。该半透膜可以是和细胞悬浮液中的细胞相容的任意一种材料。可以用于本发明的细胞洗涤设备中的半透膜包括聚丙烯(Travenol 实验室)，二乙酸纤维素(Asahi Medical)，聚乙烯醇

(Kuraray), 聚甲基丙烯酸甲酯(Toray)和聚氯乙烯(Cobe 实验室), 但是并不局限于此。针对红血球而言, 半透膜中的孔直径不应大于 1 微米但却可以小许多。细胞沿着由肋板 525 所限定的迷宫运动, 直至细胞悬浮液在出口管 530 处流出设备 500。对于其中含有 IHP 的细胞悬浮液, 然后把细胞悬浮液抽回到贮槽 505 中并且使其循环通过设备 500 直至浴(bathing)溶液中 IHP 的含量已经降低到一个可以接受的水平为止。

在半透膜 575 的另一侧为相同的盐水板 536, 它具有和细胞板 526 上的那些肋板相同的肋板 555。推动盐水板使其贴着半透膜 575 的第二侧壁 578, 从而限定了一个与由肋板 525 所限定的迷宫成镜像的迷宫。通过泵 565 把和细胞生物相容的洗涤溶液(例如盐水)从含有生物相容流体的贮槽 540 中抽出、流经管道 567, 从而在洗涤溶液入口 550 处进入细胞洗涤设备 500。

应当了解到该洗涤溶液可以是任意一种与待洗涤的细胞生物相容的溶液。其包括等渗盐水、高渗盐水、低渗盐水、Krebs-Ringer 碳酸氢盐缓冲液、Earle's 平衡盐、Hank's 平衡盐、BES, BES-Tris, HEPES, MOPS, TES 和 Tricine、但并不只局限于此。细胞培养基也可以用作一种洗涤溶液, 它们包括培养基 199、Dulbecco's 改良的 eagle's 培养基、CMRL-1066、极限必需培养基(MEM)和 RPMI-1640, 但并不只局限于此。此外, 如在本文中所定义的重填缝溶液也可以用作一种洗涤溶液。最后, 上述溶液的任意组合也可以用作一种洗涤溶液。

通过泵 565 抽吸生物相容溶液, 使之沿着由肋板 555 所限定的迷宫流经该设备, 直至该生物相容溶液在出口 560 处流出细胞洗涤设备 500。然后通过排放口 570 弃去生物相容溶液。指出如果按照与含有该细胞的溶液流向相反的方向抽取生物相容溶液的话, 设备 500 将是最有效的, 这一点是重要的。但是, 在本发明中可以预料也可以按照与含有该细胞的溶液流向相同的方向抽吸该生物相容溶液。

采用含有来自电穿孔后的细胞的细胞悬浮物的 IHP 作为一个实施方案, 当用泵抽吸两种溶液经过细胞洗涤设备 500 时, 含有 IHP 的细胞悬浮液将扩散穿过半透膜 575, 并且与此同时生物相容溶液将以相反的方向扩散穿过半透膜 575。随着扩散的继续, 细胞悬浮液逐渐被稀释并且代之以

生物相容溶液，直至 IHP 的含量达到一个可以接受的水平为止。

细胞洗涤设备 500 可以选择性地带有一个连接在细胞板 526 外侧和洗涤溶液板 536 外侧的热电元件 580。应当了解到热电元件 580 可以连接到板 526 和 536 外侧的一侧或者两侧。在洗涤循环中，热电元件 580 可以用于冷却或加热溶液。因此，应当了解到如果使用了附装有热电元件的细胞洗涤设备的话，就无需温育箱 78，因为当在起到温育箱作用的细胞洗涤设备中加热细胞时，该细胞将被重新填缝。生物相容洗涤溶液可以是重新填缝缓冲液。应当了解到温度可以通过其它方法，如水浴进行控制。

细胞洗涤设备 500 的外形可以是包括一个圆形容器的任意一种形状，其中该圆形容器的内部含有细胞悬浮液并且通过半透膜 575 与该圆形容器的外部分开。圆形容器 500 可以缓慢地旋转以帮助含有细胞的溶液穿过半透膜 575，从而除去杂质。

该细胞洗涤设备可以由与在该设备中待洗涤的细胞生物相容的任意一种材料制成。细胞板 526 和洗涤板 536 可以由柔韧的硅橡胶制成。

图 26 显示出细胞洗涤设备的另一个实施方案，它可以用于代替洗涤电穿孔后的细胞的离心机。在第二个具体的细胞洗涤设备 600 中，该洗涤设备的主要特征为一个由弹性材料，如硅橡胶制成的弹性室 605。现在翻到图 27，弹性室 605 是在该室的中心含有一个半透膜 610 的模制件。在半透膜 610 的两侧为水平的凹痕 615，该凹痕形成了一个迷宫并且遍布该弹性室的整个长度。

如图 26 所示，弹性室 605 具有引入洗涤溶液的入口 625、移走洗涤溶液的出口 630、引入含有电穿孔流体的细胞的入口 635 以及移走含有电穿孔流体的细胞的出口 640。因此，从弹性室 605 中的半透膜 610 的一侧引入的洗涤溶液环形流过迷宫并且在出口 640 处流出。把含有电穿孔后的细胞的电穿孔溶液引入半透膜 610 的另一侧，该溶液环形流过迷宫并且在出口 640 处流出。

应当了解到半透膜 610 完全分开了两侧，并且在这两侧之间的任何交流都是通过半透膜 610 进行的。半透膜具有可以使溶液通过膜 610 的孔，但是却不能让粒子，如细胞通过半透膜 610。该半透膜可以是和细胞悬浮液中的细胞相容的任意一种材料。可以用于本发明的细胞洗涤设备中的半

透膜包括聚丙烯(Travenol 实验室)、二乙酸纤维素(Asahi Medical)、聚乙烯醇(Kuraray)、聚甲基丙烯酸甲酯(Toray)和聚氯乙烯(Cobe 实验室),但是并不局限于此。针对红血球而言,半透膜中的孔直径不应大于 1 微米但却可以小许多。

可以把该弹性室放置到框架 655 中,并且侧壁 660 可以在铰链(hinge)665 和 666 上翻转,以便侧壁 660 卡住靠近侧壁 665 的弹性室 605,从而在侧壁 660 和侧壁 665 之间紧紧地楔入弹性室。侧壁 660 为一个可以加热或者冷却弹性室 610 的热电元件。侧壁 665 为一个含有滚柱 670 的能搏动的机械装置,其中该滚柱在带 675 上移动并且当滚柱绕着带 675 移动时能够顺序地挤压弹性室并且顺序地在垂直穿过侧壁 665 高度方向的柔韧悬杆 677 上施加压力。

在操作中,把弹性室放入框架 665 中并且把侧壁 660(热电元件)闭合到弹性室 605 上。当然,侧壁 660 可以是一块没有热电元件的板。在第一侧壁 615 上,把入口连接到与一个洗涤溶液贮槽相连的洗涤溶液管道上(未显示出)。出口 630 连接到一个排放管道(未显示出)。在弹性室的另一侧,把入口 635 连接到含有细胞和电穿孔流体的贮槽上(未显示出)。把出口 640 连接到一个将细胞和电穿孔流体送回细胞贮槽的管道上。

在操作中,蠕动促进激励器(peristaltic activator) 670 在洗涤溶液一侧轻轻地抽吸,从而迫使流体从入口一侧流向出口一侧。按照细胞洗涤设备 500 中所示的类似方式通过外部泵可以选择性地把两种溶液抽吸通过两个迷宫。由于该蠕动促进激励器挤压弹性室,所以通过质量传递作用提高了穿过半透膜 650 的流体的运输。该作用一直持续至电穿孔流体基本上被洗涤流体代替为止。

经 IHP 处理的红血球的应用

本发明提供了一种用于提高红细胞氧气携带能力的新方法。按照本发明的方法, IHP 与血红蛋白以一种稳定的方式结合并且改变了它的氧气释放能力。含有 IHP-血红蛋白的红细胞比单独含有血红蛋白的红细胞每分子可以释放更多的氧气,并且因此对每单位的循环的血液而言会有更多的氧气可以用于扩散进入组织。在通常的环境下, IHP 是有毒的并且不能作为

一种普通的药物被耐受。但是，在这一新的工艺中把 IHP 连接到血红蛋白上却中和了 IHP 的毒性。在缺少严重的慢性失血的情况下，采用根据本方法制备的组合物来治疗产生了持续大约 90 天的有益效果。

经 IHP 处理的红血球的另一个好处是当储存时该红血球不丧失玻耳效应。按照常规方法所储存的普通红血球在 24 小时后便不能恢复其最大的氧气携带能力了。这是因为在储存过程中位于普通红血球中的 DGP 扩散离开了血红蛋白分子，并且在输血后必须由体内物质(body)所代替。与此相反，按照本发明处理后的红血球在储存的过程中保留了其最大的氧气携带能力，因此它们能在向人或者动物输血后立即把最多的氧气传递到组织中去。

经 IHP 处理后的 RBC 的用途是十分广泛的，它包括治疗许多急性和慢性疾病，这些疾病包括但不限于住院病人、心血管手术、慢性贫血、大手术后的贫血、冠状梗塞以及有关的问题、慢性肺病、心血管病人、自身输血、封装的红血球输注(出血、外伤或手术)的增加、充血性心力衰竭、心肌梗塞(心脏病发作)、末梢血管疾病、间歇性跛行、循环休克、出血性休克、贫血与慢性缺氧症、呼吸硷血症、代谢性碱中毒、镰状细胞贫血、由肺炎、手术引起的肺容量减少、肺炎、外伤、胸穿刺、坏疽、厌氧感染、血管疾病、如糖尿病、高压室治疗的替代或补充、手术中红细胞的再利用、心机能不全、缺氧症-仅次于慢性疾病、器官移植、一氧化碳、氧化氮和氰化物中毒。

针对上述任何一种或多种疾病，可以通过向人或动物体内输入介于大约 0.5 至 6 个单位(1 单位 = 500ml)之间的按照本发明制备的经 IHP 处理的血液来治疗人或动物。在某种情况下，可能存在用 IHP 处理过的血液基本上完全代替病人体内的所有普通血液的情况。把 IHP 处理后的红血球向病人或动物给药的体积依赖于待治疗的症状。此外，IHP 处理过的红血球的体积也依赖于在红血球悬浮液中 IHP 处理过的红血球的浓度。应当了解到把 IHP 处理后的红血球向病人给药的量并不是非常严格的并且可以在很宽的范围内变化而且仍然有效。

除了 IHP 处理后的封装红血球每单位能够向组织传递 2 至 3 倍的氧气以外，IHP 处理后的封装 RBC 类似于普通的红血球。因此医生会选择施用 1

个单位的 IHP 处理后的封装红血球，而不是选择 2 个单位的普通红血球。除了包括把 IHP 包裹在细胞中的处理步骤以外，经 IHP 处理的封装红血球可以按照与本血液处理方法类似的方法在血液处理中进行制备。

虽然已参照公开的实施方案详细地描述了本发明，但应当了解，在本发明附加的权利要求中所描述的精神和范围内可以实现许多变化和改进。

说明书附图

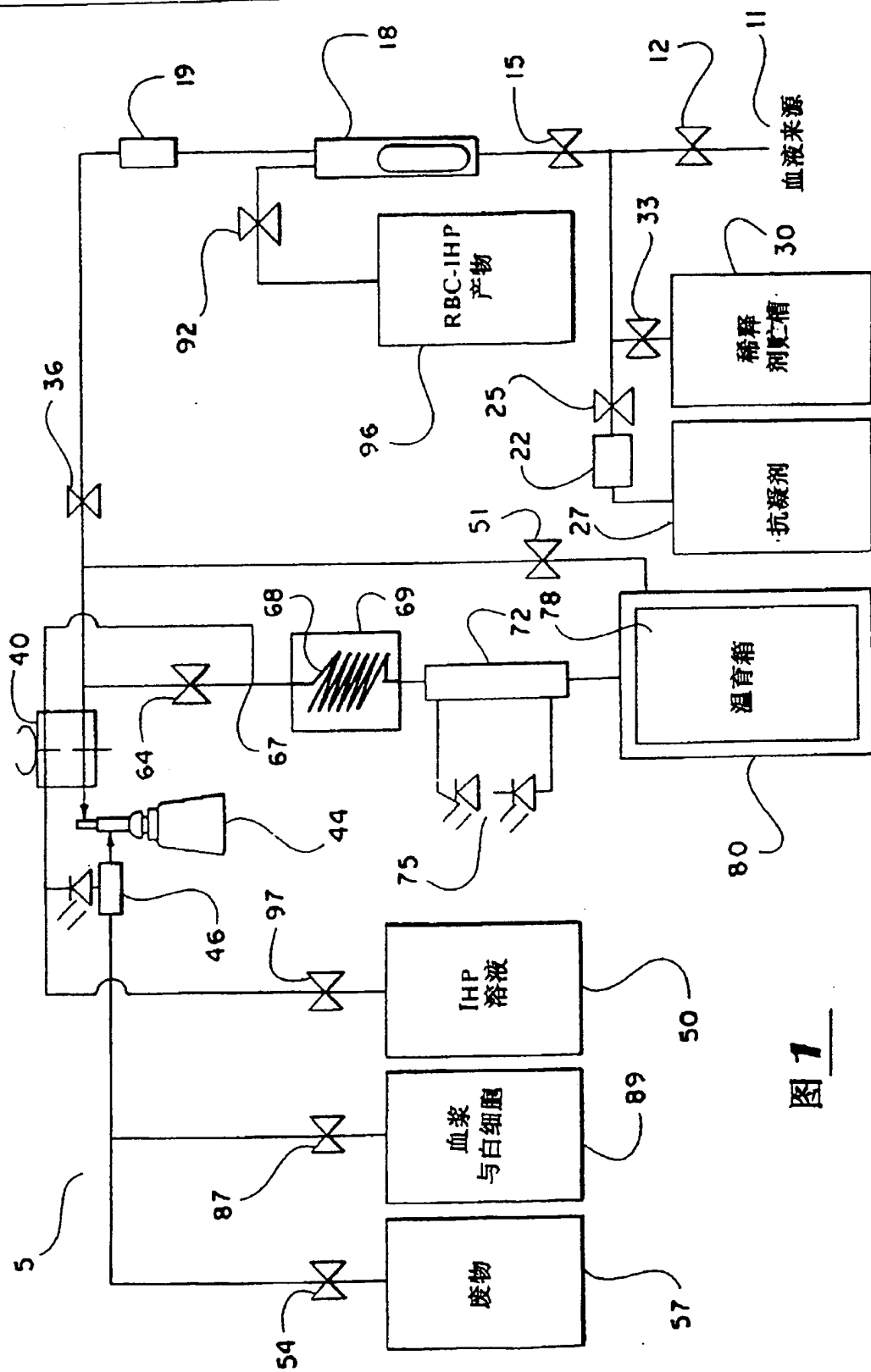


图 1

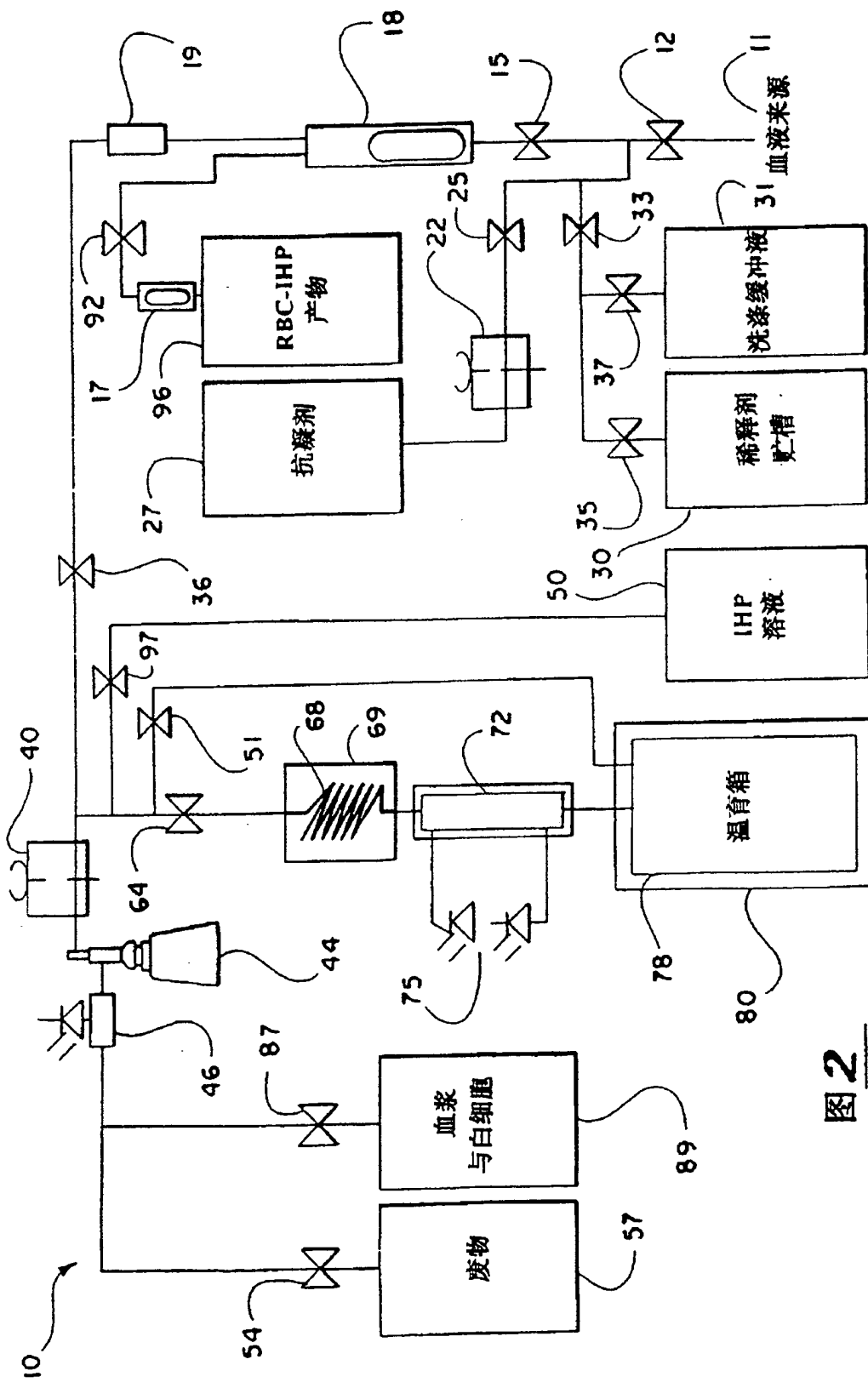


图 2

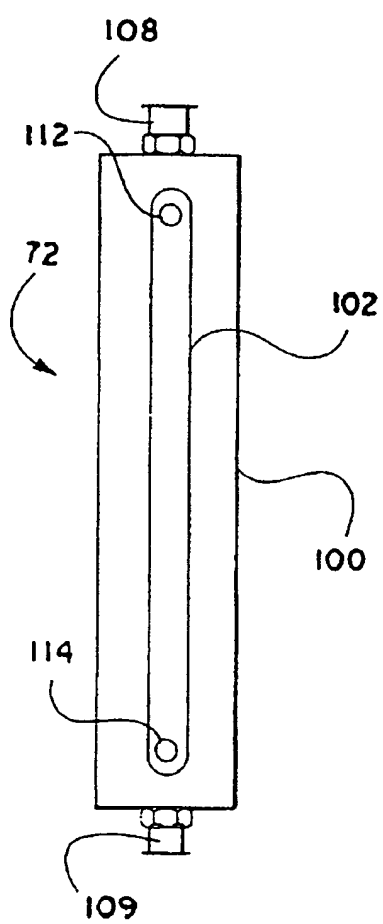


图3

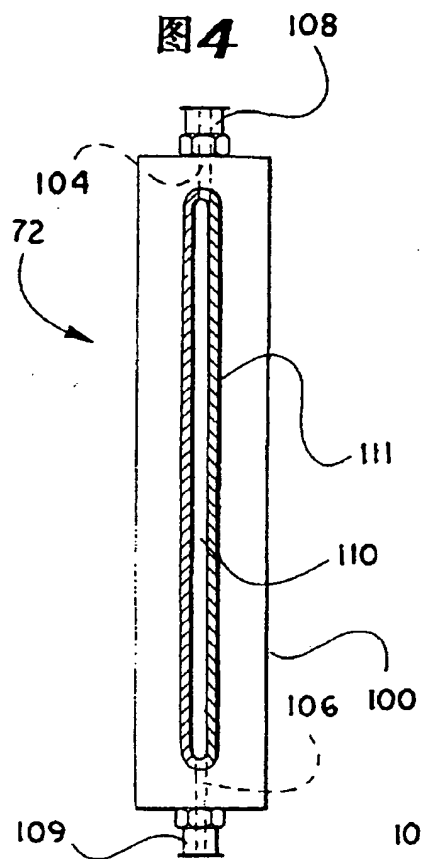


图4

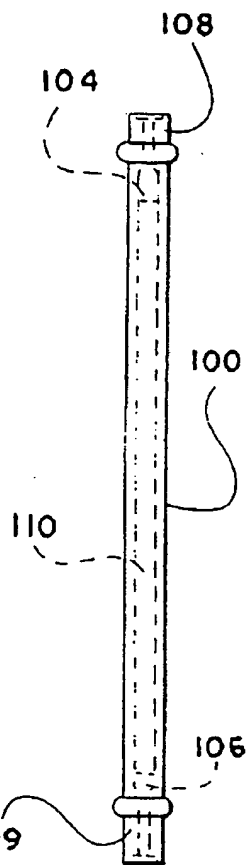


图5

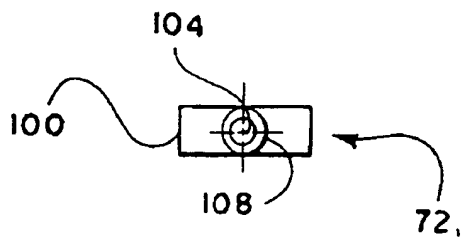


图6

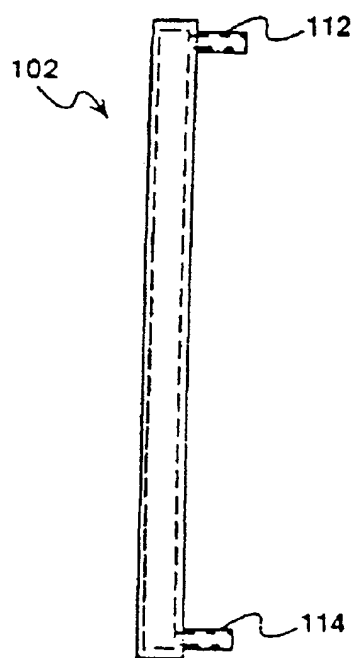


图 7

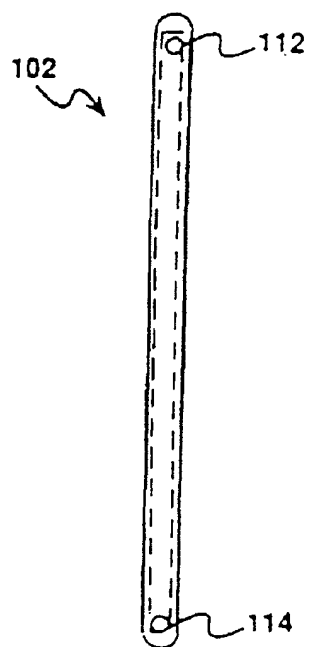


图 8

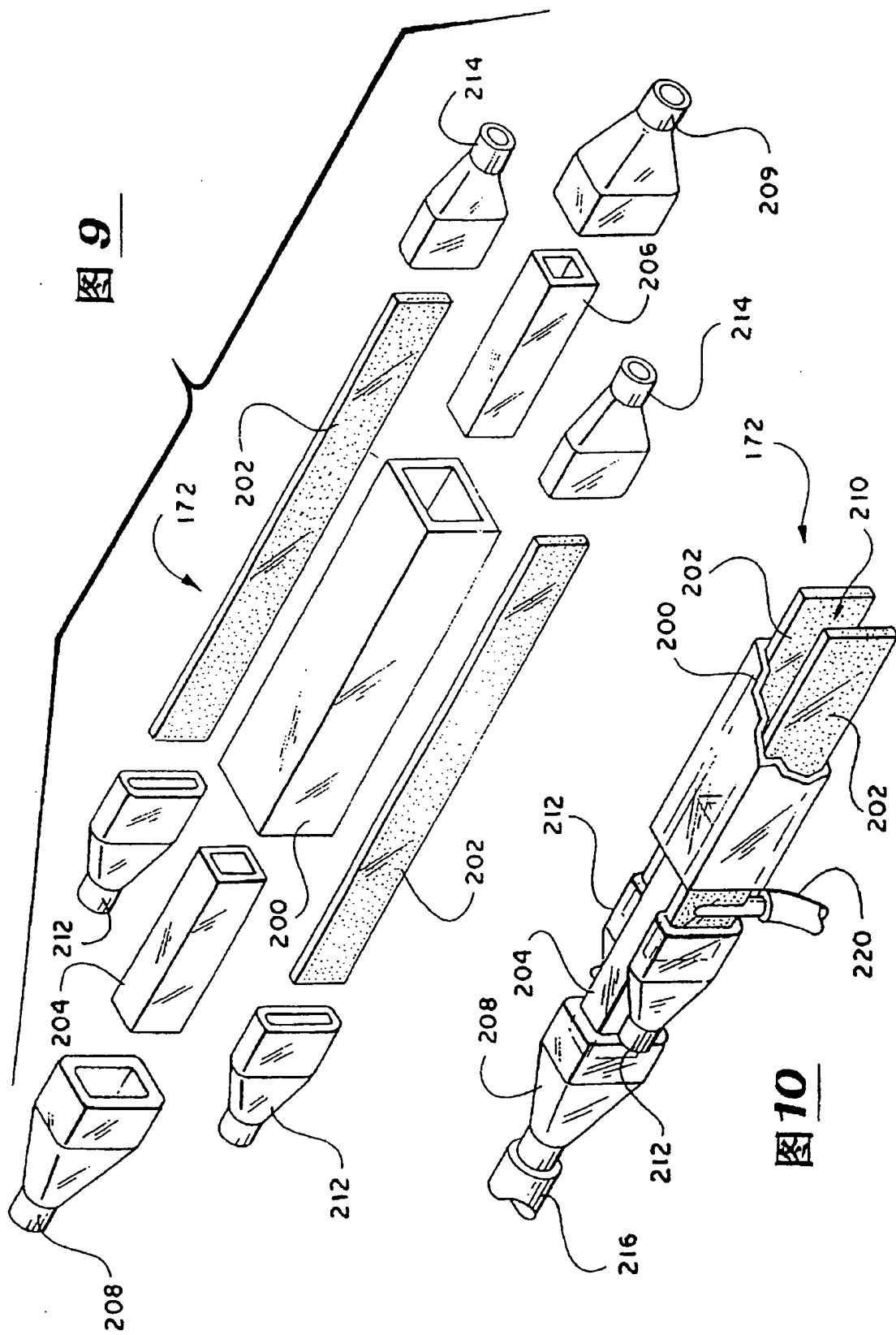


图 9

图 10

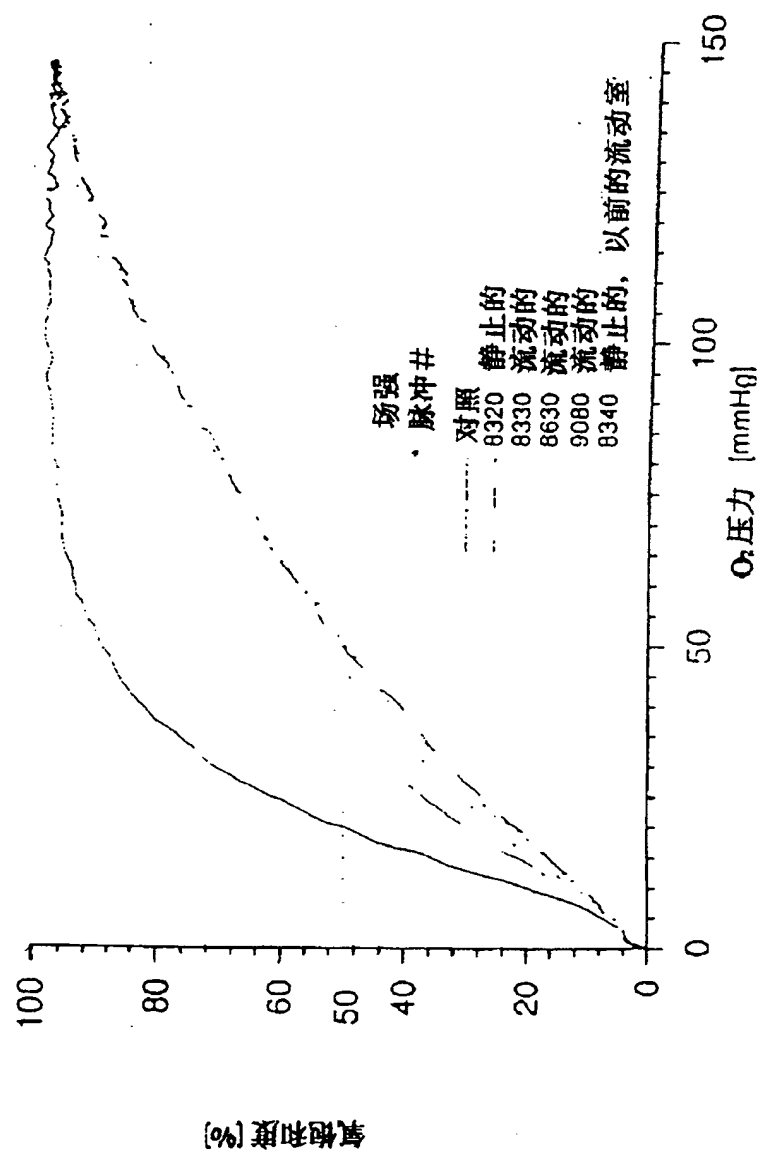


图 11

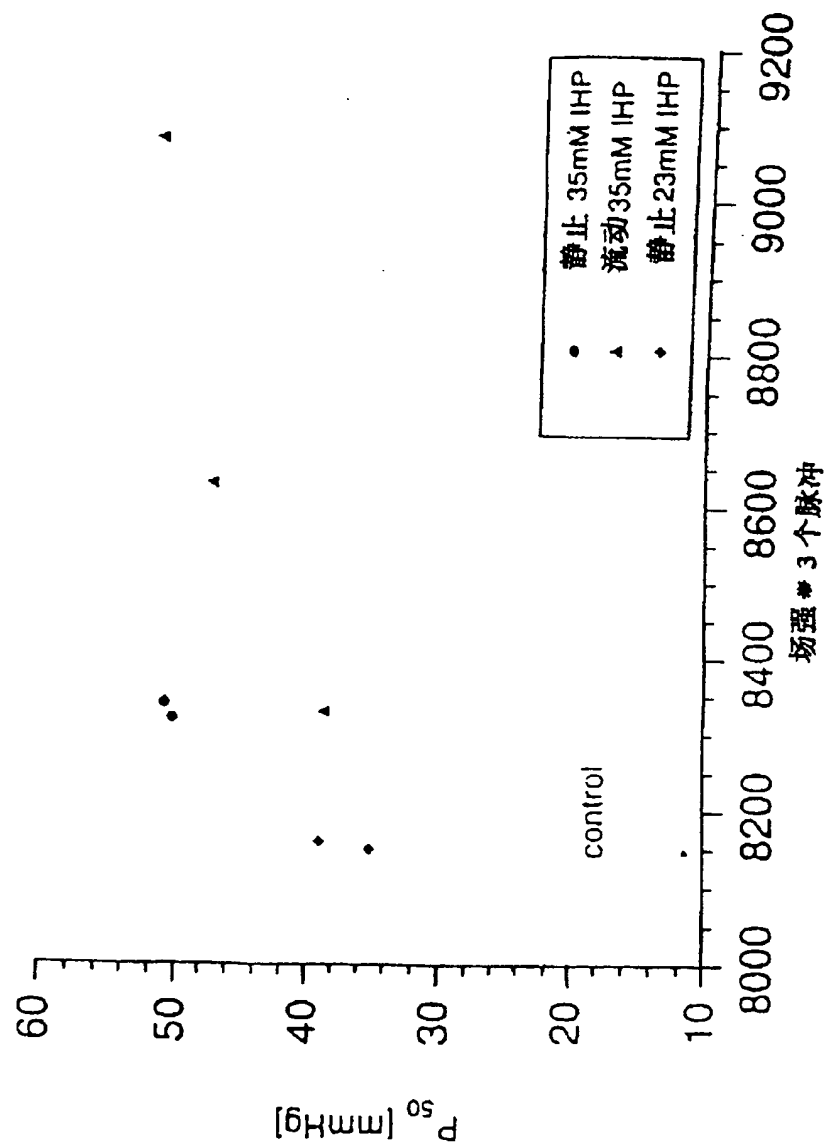


图 12

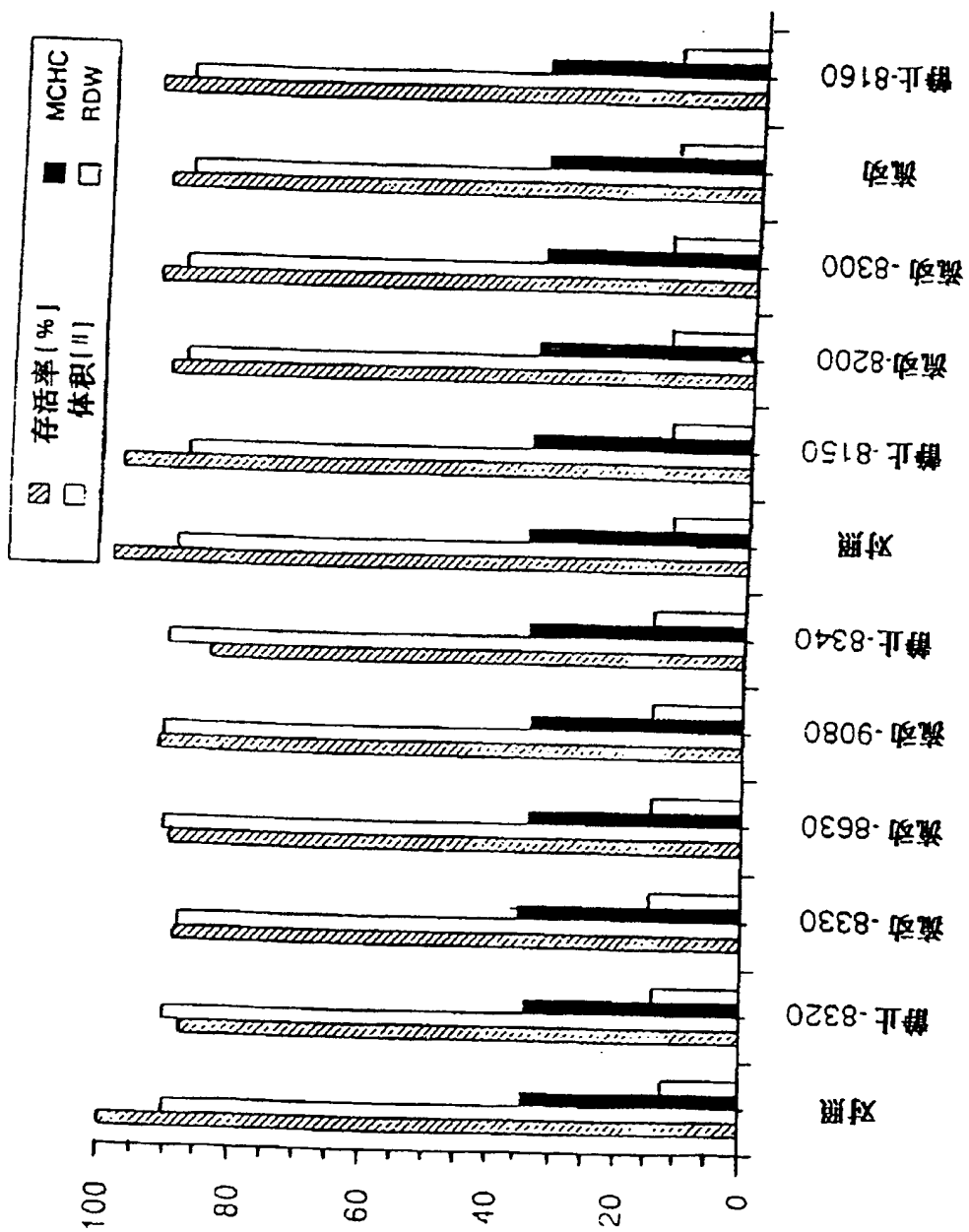


图 13

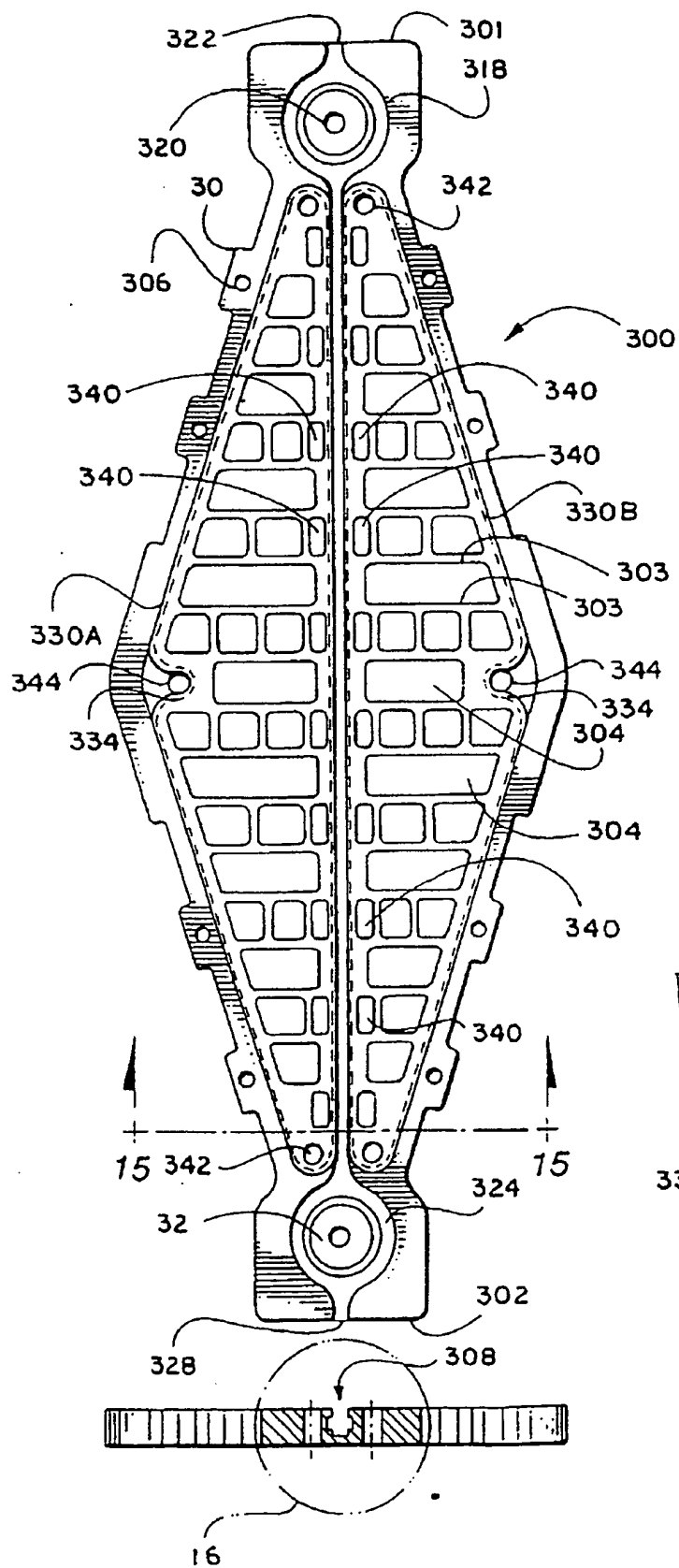


图 14

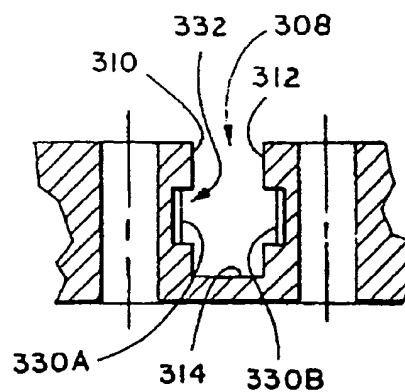


图 16

图 15

图 17

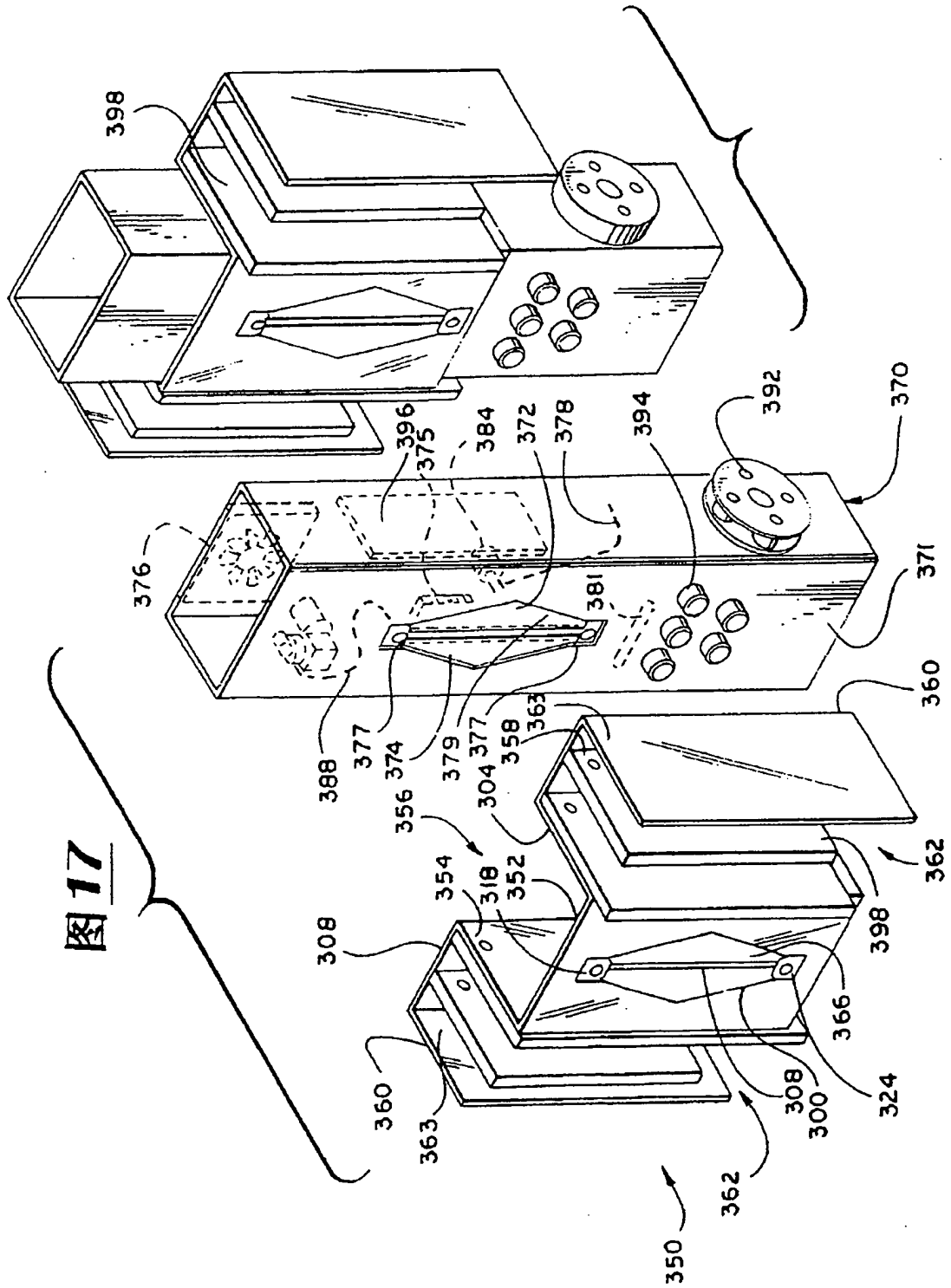


图 18

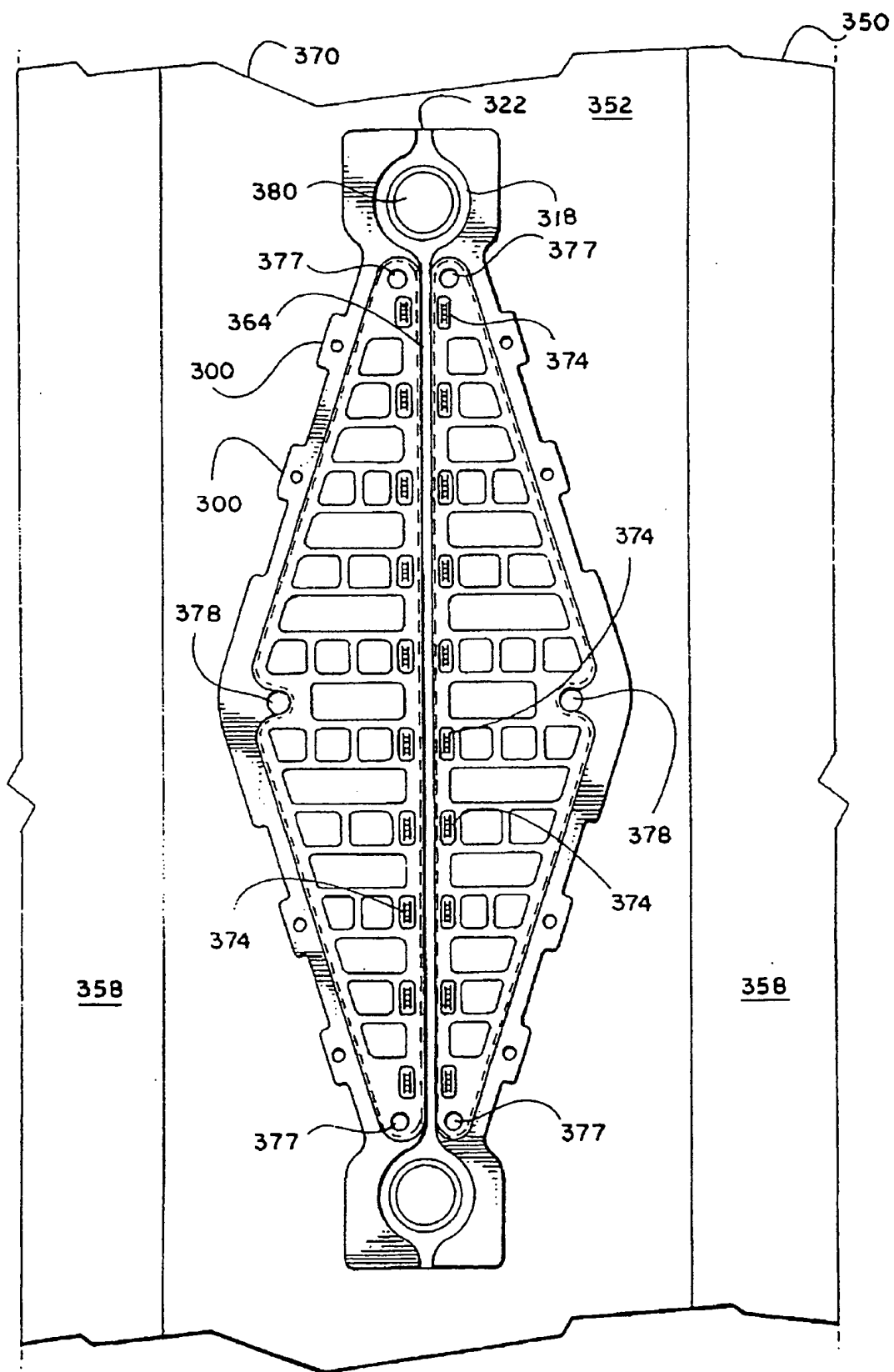


图 19

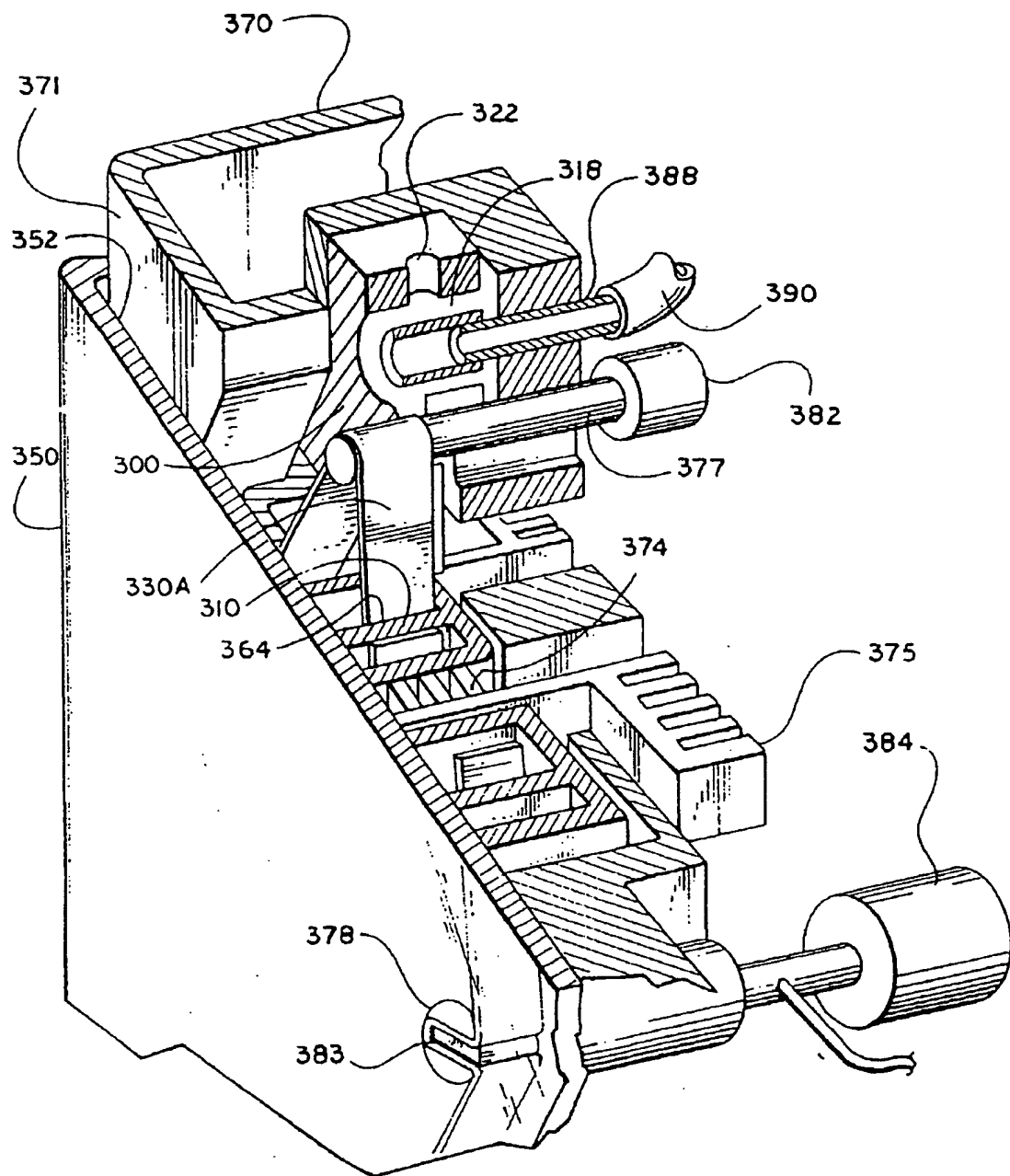


图20

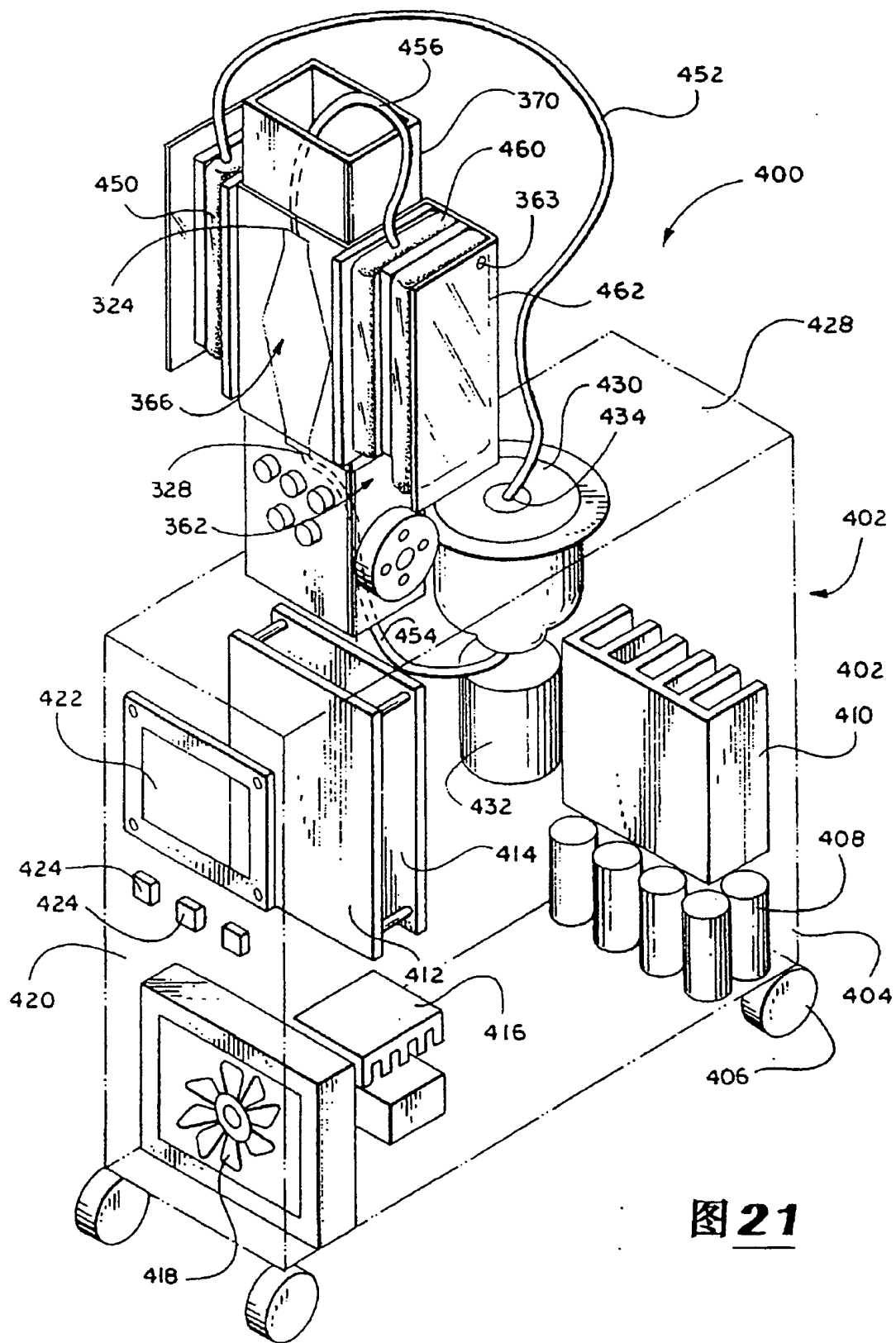


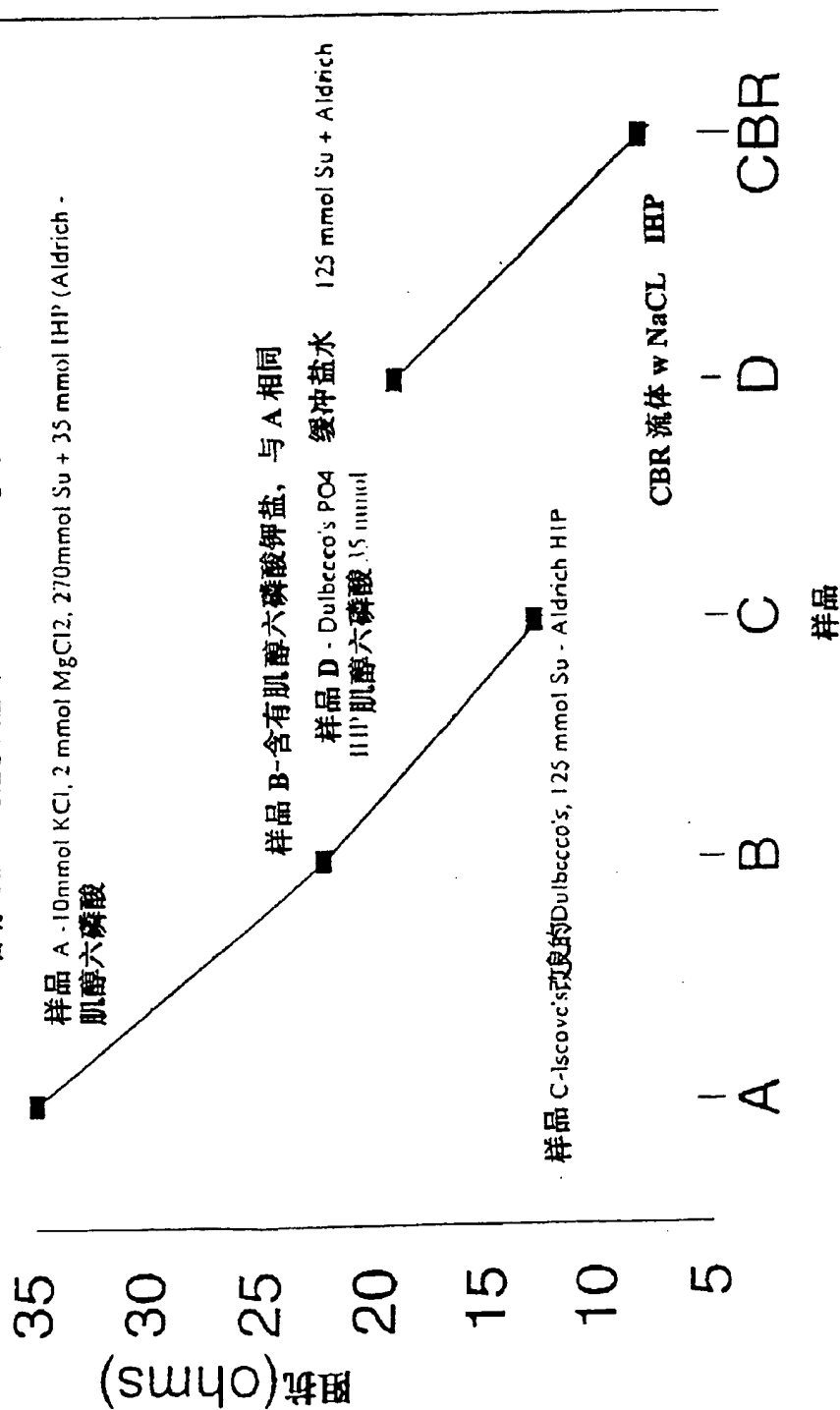
图 21

图22

800V, 4°C, 40%Hct

样品 A - D w Aldrich IHP @ 35 mmol

含有 IHP w NaCl 盐的 CBR 流体 @ 35 mmol



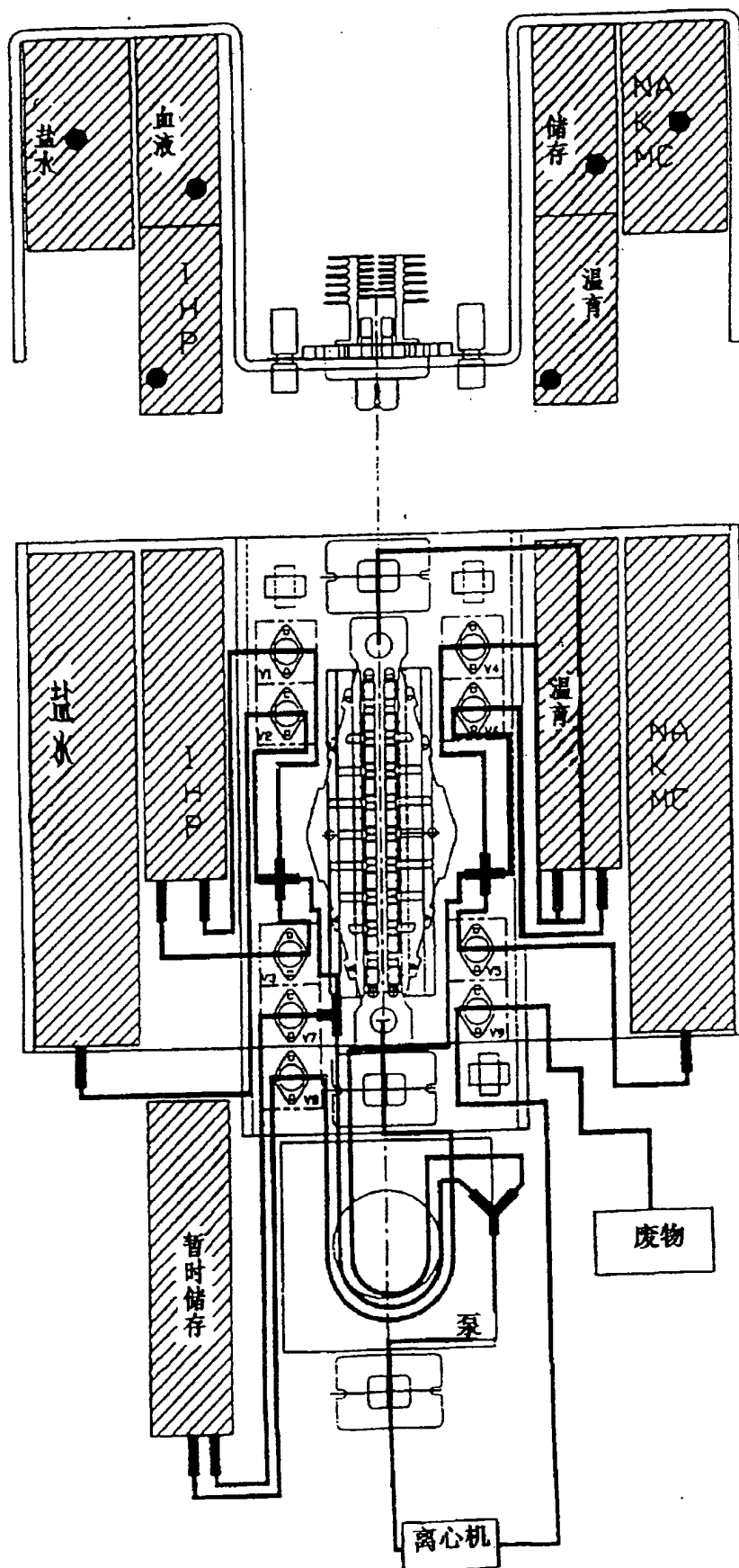


图23

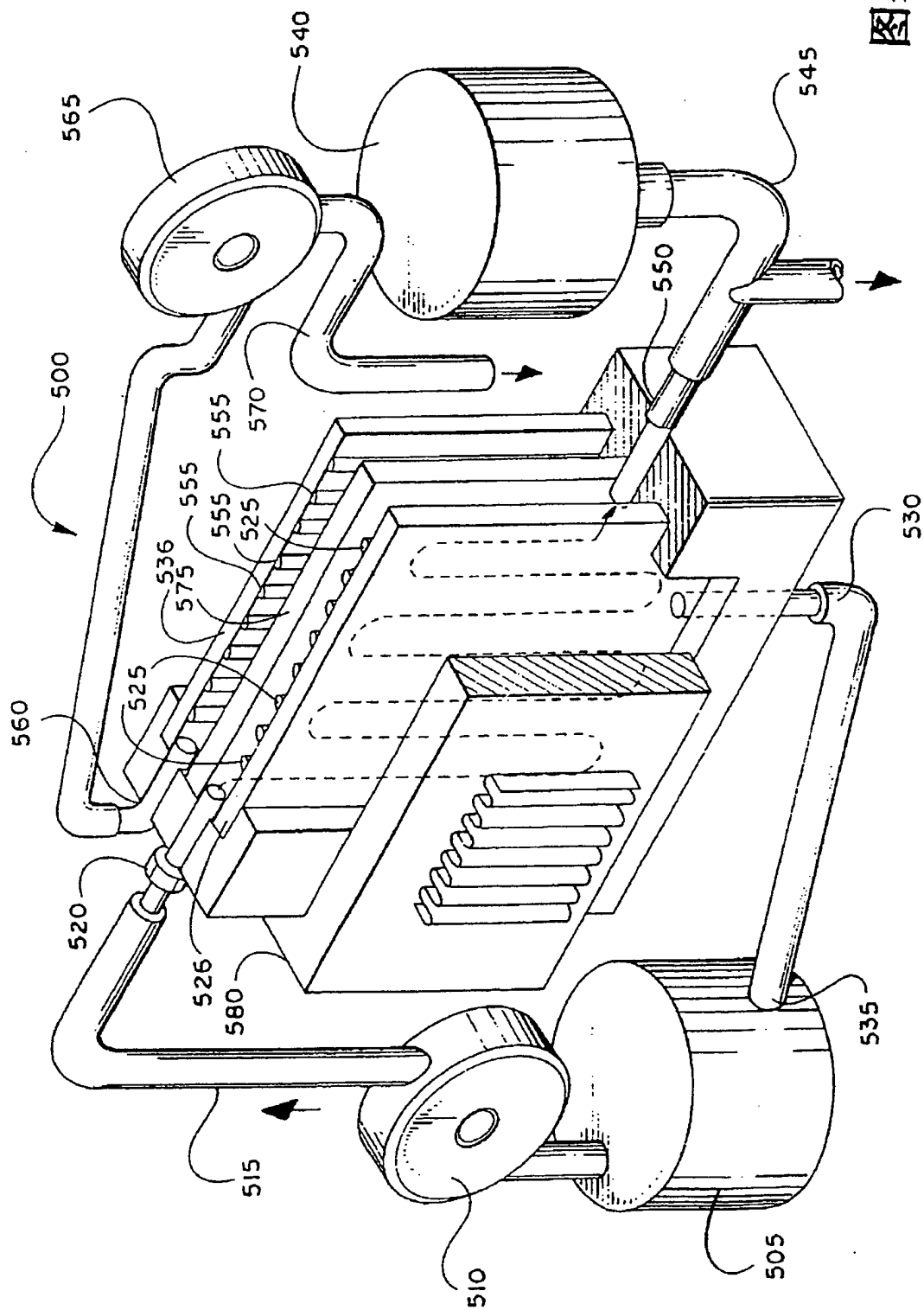


图 24

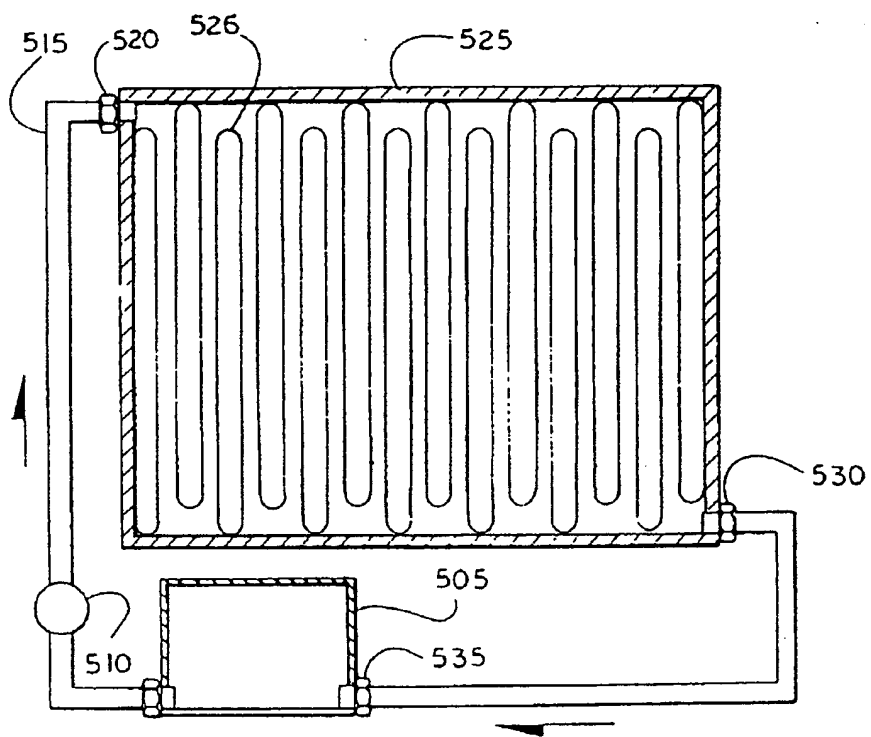


图25

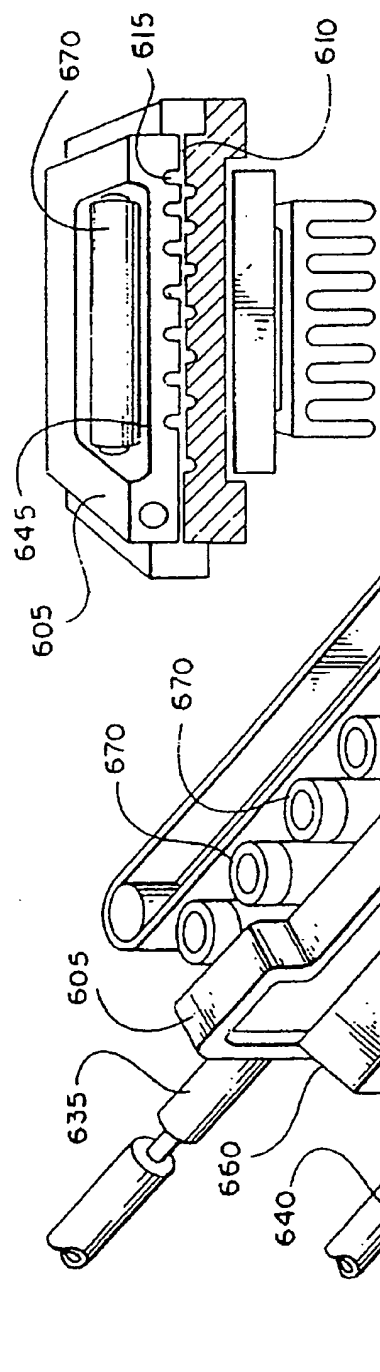


图 26

图 27

图 28

